



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**

**Cécile CAPDEVILLE**

le jeudi 31 mai 2018

**Titre :**

Évaluation des capacités de résistance et de résilience de l'écosystème mangrove en réponse à des apports d'eaux usées domestiques prétraitées

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED SDU2E : Écologie fonctionnelle

**Unité de recherche :**

Laboratoire EcoLab – UMR 5245 – CNRS/UT3/INPT

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Jean-Luc ROLS, Professeur des Universités, Université Toulouse III – Paul Sabatier

Joséphine LEFLAIVE, Maître de conférences, Université Toulouse III – Paul Sabatier

François FROMARD, Directeur de recherche, CNRS, Toulouse

**Jury :**

Marc BOUVY, Directeur de recherche, IRD, Montpellier (Rapporteur)

Gérard THOUZEAU, Directeur de recherche, CNRS, Brest (Rapporteur)

Robert DURAN, Professeur des Universités, UPPA, Pau (Examinateur)

Catherine FERNANDEZ, Professeur des Universités, Université Aix-Marseille (Présidente)



Mangroves form the “rainforest of the sea”  
(Warne, 2011).



## Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier mes directeurs de thèse, Joséphine Leflaive et Jean-Luc Rols qui m'ont choisie et ont rendu cette thèse possible. Je vous remercie de m'avoir encadrée et soutenue tous le long de ma thèse, merci pour votre implication dans les manips, la rédaction et ses corrections, ainsi que votre aide lors des missions sur le terrain.

Je souhaite également remercier François Fromard, directeur de thèse non officiel, son impressionnante connaissance des mangroves, du terrain et de Mayotte m'a beaucoup apportée.

Je tiens à remercier les membres du jury, Marc Bouvy, Robert Duran, Catherine Fernandez et Gérard Thouzeau, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse et ont permis d'enrichir les discussions.

Merci au directeur du laboratoire EcoLab, Franck Gilbert pour son accueil dans le laboratoire, son dynamisme et ses encouragements.

Ce travail de thèse a été financé contractuellement par le SIEAM, dans le cadre d'un programme de soutien pluriannuel financé par l'ONEMA (n°2014/03) en matière d'assainissement, d'adduction d'eau potable à l'outre-mer et de convention d'aide aux investissements. Dans ce contexte, les financements nécessaires à ma bourse de thèse, aux coûts de fonctionnement et de missions, ont été attribués par le SIEAM auprès du laboratoire EcoLab. Je tiens à remercier le SIEAM pour l'accès au site expérimental de Malamani, au maintien de ce site avec l'emploi de Kissimati Abdallah et aux échanges avec les autres entités insulaires dans le cadre du comité de pilotage de l'opération (Conservatoire du littoral, Université de Mayotte, Agence régionale de santé, etc.).

Je tiens particulièrement à remercier Kissimati pour son accueil sur le site expérimental mais également à Mayotte dans sa globalité. Merci pour ton aide sur le terrain et les manips (même tard le soir), merci de m'avoir entraînée à me déplacer aussi vite que toi dans la mangrove et enfin de m'avoir fait découvrir ta culture et tes coutumes.

Je remercie également tous les membres de l'équipe CIRCE, en particulier Frédéric Azémar pour ses conseils en image et dans l'identification des petites bêtes du sédiment, Arthur Compin pour ses conseils en informatique, Romain Walcker pour ses conseils sur le terrain et la mangrove et pour son implication dans l'analyse d'images satellites, enfin merci à Anne-Marie et Eric pour leur soutien et les chocolats « bousteurs » tout le long de la thèse.

Merci tout particulier à Jessica Ferriol et Daniel Dalger pour leur aide dans les manips, leur préparation et leur interprétation. Merci également aux stagiaires Camille et Marie.

Je tiens aussi à remercier quelques personnes pour leurs implications dans mon travail de thèse : Thomas Pommier, Evelyne Buffan-Dubau, Patricia Jargeat et les membres de la plateforme Génotoul.

Merci à Régine, Catherine, Cyril et Cécile pour leur bonne humeur, leur soutien et leur patience pour la gestion de mes déplacements professionnels.

Merci à Frédéric, Sylvain et Didier, le bureau des « MacGyvers » pour leur aide et leur humour décapant !

Je tiens à remercier les autres doctorants du laboratoire pour tous les bons moments passés avec eux pendant plus de 3 ans, Joey, Alice, Nico, les deux Quentin, Hashrada, Thibault, Maiwen, Soumaïla et en particulier Margot pour tes conseils et ton soutien même après la fin de ta thèse, Marjorie et Doriane pour votre gentillesse, vos rires et votre soutien, et la petite dernière Emilie pour nos goûters remotivants, nos papotages et ton soutien. Merci les filles !

Je souhaite également remercier les membres du petit écosystème de Clermont, qui même à distance m'ont toujours encouragée : Laurianne, Benjamin, Muriel et Pierre, Tiphaine, Florent, Isabelle, Joan et Clarisse.

Merci à mes amis, Dorian, Mathilde, Marie, Yannick, Carine, Camille, Aurore, Nadège, et Adeline et à ma famille, mes parents, mon frère et mes grands-parents, ils ont toujours été là même dans les coups durs.

Enfin merci à toi Louis pour tout ! Merci pour ta patience, ton soutien, tes bons petits plats, tu m'as permis d'arriver au bout de cette thèse.

# Sommaire

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Synthèse bibliographique.....</b>	<b>5</b>
1. Gestion des eaux usées .....	7
1.1. Les différents types d'eaux usées.....	7
1.2. Les eaux usées domestiques .....	7
1.2.1. Composition.....	7
1.2.2. Réglementation .....	10
1.2.2.1. Caractérisation des eaux usées domestiques .....	10
1.2.2.2. Réglementation des rejets d'eaux usées domestiques .....	11
1.2.3. Systèmes d'assainissement et contraintes.....	12
1.2.3.1. Procédés intensifs .....	14
1.2.3.2. Les procédés extensifs .....	17
1.2.3.3. Contraintes de l'assainissement des EUD .....	21
2. L'écosystème mangrove.....	22
2.1. Définition, sensibilité et rôles.....	22
2.1.1. Définition et localisation des mangroves.....	22
2.1.2. Zonation des mangroves .....	24
2.2. Composition de l'écosystème mangrove.....	27
2.2.1. Compartiment végétation .....	27
2.2.1.1. Diversité des espèces végétales de mangrove .....	27
2.2.1.2. Adaptations des palétuviers aux conditions environnementales .....	32
2.2.2. Compartiment faune .....	34
2.2.2.1. Diversité de la faune des mangroves .....	34
2.2.2.2. Cas particulier des crabes .....	37
2.2.2.2.1. Diversité des crabes de mangrove .....	37
2.2.2.2.2. Les espèces ingénieurs.....	40
2.2.2.2.3. Rôles fonctionnels des crabes dans les mangroves .....	41
2.2.2.3. Cas particulier de la méiofaune .....	43
2.2.3. Les communautés microbiennes des sédiments .....	44
2.2.3.1. Les champignons des mangroves .....	45
2.2.3.2. Les phototrophes.....	45

2.2.3.3. Les microorganismes impliqués dans le cycle de l'azote.....	46
2.2.4. Services écosystémiques.....	50
2.2.5. Un environnement menacé.....	54
2.2.6. Impact des eaux usées sur les mangroves.....	56
2.2.7. Bio-épuration des eaux usées par la mangrove .....	61
<b>Chapitre 2 : Contexte et site d'étude .....</b>	<b>63</b>
1. L'île de Mayotte et contexte d'étude.....	65
1.1. Caractéristiques et localisation géographique .....	65
1.2. Les mangroves à Mayotte.....	67
1.3. Systèmes d'assainissement à Mayotte.....	69
2. Description du site d'étude.....	71
3. Objectifs du projet de thèse .....	76
<b>Chapitre 3 : Evaluation de la stabilité de la microflore des sédiments de mangrove subissant une perturbation sur du long terme.....</b>	<b>79</b>
<b>Chapitre 4 : Evaluation de la stabilité de la végétation et de la faune benthique (crabes et méiofaune) de mangrove face à une perturbation de long terme .....</b>	<b>121</b>
<b>Chapitre 5 : Dynamiques de réponse résistance/résilience de la végétation et de la faune d'une mangrove soumise à une perturbation .....</b>	<b>165</b>
<b>Chapitre 6 : Dynamiques de réponse résistance/résilience de la communauté microbienne d'une mangrove.....</b>	<b>205</b>
<b>Chapitre 7 : Conclusions, discussion générale et perspectives .....</b>	<b>251</b>
1. Conclusions .....	253
2. Discussion générale.....	261
3. Perspectives .....	269
3.1. Perspectives à court terme pour le site d'étude de Mayotte .....	269
3.2. Perspectives sociétales et environnementales .....	271
<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>275</b>



## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Classification des eaux usées domestiques. ....	8
<b>Figure 2.</b> Le fonctionnement d'une station d'épuration. ....	15
<b>Figure 3.</b> Principes de fonctionnement des lits bactériens (A), des disques biologiques (B) et des boues activées (C) utilisés dans le traitement secondaire des eaux usées. ....	16
<b>Figure 4.</b> Principe de fonctionnement des filtres plantés verticaux. ....	18
<b>Figure 5.</b> Principes de fonctionnement du lagunage naturel. ....	19
<b>Figure 6.</b> Répartition des mangroves dans le monde. ....	23
<b>Figure 7.</b> Représentation schématique de la zonation caractéristique d'une mangrove de Zanzibar en vue transverse, répartition des différentes espèces de palétuviers de l'arrière mangrove au front de mer. ....	25
<b>Figure 8.</b> Répartition mondiale des espèces végétales de mangrove appartenant aux deux aires biogéographiques : l'aire Indo-Pacifique-Ouest et l'aire Atlantique-Pacifique-Est. ....	27
<b>Figure 9.</b> Exemples de structures racinaires de palétuviers. ....	30
<b>Figure 10.</b> Arbre phylogénétique simplifié rassemblant les genres de la famille des Ocypodidae répartis dans la zone Indo-Pacifique Ouest (IPO) et dans la zone Atlantique-Pacifique Est (APE). ....	38
<b>Figure 11.</b> Exemples de crabes appartenant à la famille des Sesarmidae et des Grapsidea. ...	40
<b>Figure 12.</b> Cycle de l'azote dans les sédiments de mangrove. ....	47
<b>Figure 13.</b> Les services écosystémiques fournis par les mangroves. ....	52
<b>Figure 14.</b> Localisation de l'île de Mayotte dans l'Océan Indien. ....	65
<b>Figure 15.</b> Vue satellite de la barrière récifale bordant le lagon de l'île de Mayotte. ....	66
<b>Figure 16.</b> Répartition des mangroves sur le littoral de l'île de Mayotte. ....	68
<b>Figure 17.</b> Evolution de la population de l'île de Mayotte depuis 1958 au dernier recensement en 2017. ....	69
<b>Figure 18.</b> Localisation du village de Malamani et du site d'étude par rapport à la mangrove de la Baie de Bouéni. ....	72
<b>Figure 19.</b> Acheminement des eaux usées du lotissement de Malamani vers la mangrove ...	73
<b>Figure 20.</b> Représentation du dispositif expérimental de distribution des eaux usées domestiques prétraitées dans les faciès de mangrove <i>C. tagal</i> et <i>R. mucronata</i> . ....	74
<b>Figure 21.</b> Répartition des chapitres de thèse par compartiments de la mangrove. ....	76
<b>Figure 22.</b> Présentation des parcelles d'étude et des zones d'échantillonnage. ....	82
<b>Figure 23.</b> Montage expérimental de substrats artificiels disposés sur le sédiment pour chaque parcelle de mangrove. ....	83
<b>Figure 24.</b> Représentation des différents types d'échantillonnage dans toutes les parcelles : (A) collecteur de litière, (B) quadra de suivi de la communauté de crabes, (C) placette d'échantillonnage de sédiments. ....	168
<b>Figure 25.</b> Schéma conceptuel illustrant (i) les interactions naturelles existant entre les compartiments de la mangrove, (ii) les effets directs et indirects des eaux usées domestiques (EUD) prétraitées rejetées dans la mangrove, et (iii) les actions des différents acteurs de la mangrove sur l'élimination des EUD. ....	259



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Principales prescriptions relatives aux rejets d'eaux usées domestiques provenant de stations d'épuration soumises aux dispositions de la directive n°91/271/CEE du 21 Mai 1991 et de l'arrêté du 22 juin 2007, annexe I et II, complété par l'arrêté du 21 juillet 2015.....	13
<b>Tableau 2.</b> Répartition mondiale des 73 espèces végétales de mangrove et hybrides séparés par famille entre l'aire biogéographique Indo-Pacifique-Ouest et l'aire biogéographique Atlantique-Pacifique-Est. ....	28



## **Introduction générale**



Les mangroves sont des écosystèmes écotones, à l'interface entre le milieu terrestre et le milieu marin (Blasco, 1991). Ce sont des forêts côtières situées dans la zone intertidale des latitudes tropicales et subtropicales, couvrant, en 2014, 81 484 km<sup>2</sup> (Hamilton and Casey, 2016). Elles sont organisées en bandes de végétation parallèles à la côte, chacune dominée par une espèce de palétuviers et répartie le long des gradients environnementaux (Robertson *et al.*, 1992; Ball, 1998).

Les mangroves sont considérées comme l'un des écosystèmes les plus productifs au monde (Komiya *et al.*, 2000). Elles remplissent une large gamme de services écosystémiques pour les communautés marines et les sociétés humaines voisines. La végétation des mangroves participe à la stabilisation des sédiments (Blasco, 1991) et protège le littoral de l'action érosive des vagues et du vent (Alongi, 2008). Elles représentent une grande source de nourritures et matériels (bois) (Lee *et al.*, 2014), ainsi qu'un habitat pour la faune (Aburto-Oropeza *et al.*, 2008). Les mangroves fournissent un apport permanent de matière organique, particulièrement bénéfique pour les crabes et les décomposeurs (Botto *et al.*, 2006). De plus, elles participent activement à la séquestration des nutriments et la minéralisation de la matière organique issue du lessivage des sols (M. Wang *et al.*, 2010).

Ce milieu est continuellement soumis à des contraintes environnementales variables (la salinité, le cycle des marées, la température et l'alternance des saisons) (Feller *et al.*, 2010) mais également à des pressions anthropiques (effluents contaminés, déforestation) à cause de leur proximité avec les aquacultures, les ports et les centres urbains (Zhang *et al.*, 2014). Les mangroves sont des environnements menacés, à ce jour, 32 % des mangroves auraient disparus à cause des activités humaines (Giri *et al.*, 2011; Hamilton et Casey, 2016). De plus, les mangroves sont en danger à cause de la hausse des températures et de l'élévation du niveau des océans, mais aussi à cause d'épisodes climatiques de plus en plus fréquents et violents (Gilman *et al.*, 2008).

Mayotte, département français situé dans l'Océan Indien au Nord-Ouest de Madagascar, est bordé d'un lagon de 1500 km<sup>2</sup> parmi les plus vastes et les plus riches en biodiversité. Celle-ci est actuellement fortement menacée par les effluents anthropiques. En effet, l'île de Mayotte doit faire face à une forte croissance démographique depuis les années 80. Cette explosion démographique entraîne un développement urbain important sur le littoral, une hausse de la consommation annuelle en eau (170 m<sup>3</sup> par habitants) et donc une augmentation de la quantité d'eaux usées domestiques (EUD) produite. Pour des raisons foncières, économiques et environnementales, Mayotte rencontre des difficultés dans l'assainissement des EUD.

Actuellement, la majorité de ces EUD se déversent par ruissellement dans le lagon sans traitement préalable. Ce phénomène génère non seulement des risques de pollution pour les écosystèmes naturels, mais entraîne également des conditions d'insalubrité et des risques sanitaires importants. Face à ces contraintes, le Syndicat Intercommunal des Eaux et de l'Assainissement de Mayotte (SIEAM) évalue depuis plusieurs années des techniques alternatives de traitement des EUD dites « extensives », potentiellement mieux adaptées au contexte mahorais.

Plusieurs études ont testé le potentiel des mangroves à éliminer les nutriments présents dans les eaux usées (*e.g.* Wong *et al.*, 1995, 1997). L'utilisation de la mangrove comme exutoire suite à un traitement primaire des EUD est alors envisagé et mis en place en 2008 par le SIEAM dans la plus grande mangrove de l'île, sur le site d'étude à Malamani, en collaboration scientifique avec des chercheurs CNRS du laboratoire toulousain EcoLab (coordination de François Fromard). Les EUD d'un lotissement sont collectées et prétraitées par un décanteur-digesteur, puis déversées dans des parcelles de mangrove dominées par les palétuviers *Ceriops tagal* ou *Rhizophora mucronata* et ayant des caractéristiques contrastées. Un suivi de ce dispositif depuis 2008, d'abord dans le cadre de la thèse de Mélanie Herteman (2010), puis par des missions de terrain des chercheurs d'EcoLab, enfin dans le cadre de ma thèse (2014-2017) ont permis de collecter suffisamment de données pour établir des bilans de fonctionnement à long terme (de 7 à 9 ans) des compartiments de la mangrove, à savoir la végétation, la faune (crabes et méiofaune) et les sédiments (dont leurs communautés microbiennes associées). Une modification du dispositif de déversement des EUD prétraitées dans les parcelles en 2015 a permis de tester les capacités de résistance et de résilience des différents compartiments de la mangrove sur une durée de 2 ans.

Ce mémoire de thèse est structuré en 7 chapitres, dont la partie Résultats est construite sur la base de 4 articles scientifiques aux statuts en cours de publication, soumis pour publication ou en préparation. Une synthèse bibliographique présente les volets abordés dans cette étude, suivie d'un chapitre présentant le contexte de l'étude. Enfin, une discussion finale permet de conclure cette étude et d'ouvrir des perspectives.



## **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique**



## 1. Gestion des eaux usées

### 1.1. Les différents types d'eaux usées

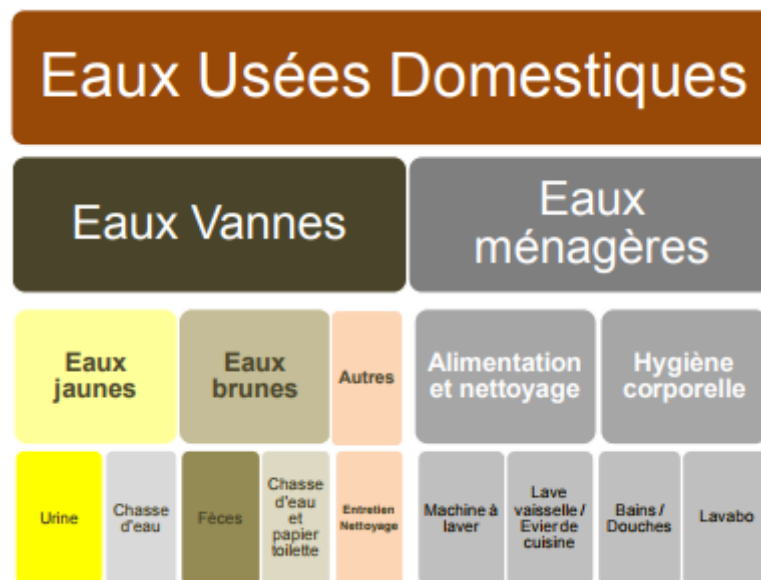
Les milieux naturels limitrophes des zones urbaines peuvent être exposés à des eaux résiduaires urbaines susceptibles de transporter des contaminants et par conséquent d'altérer ces environnements. D'après l'article 2 de la directive n°91/271/CEE du 21 mai 1991 relative au traitement des eaux résiduaires urbaines, celles-ci ont fait l'objet d'utilisations domestique, agricole ou industrielle. Elles sont différenciées par trois grandes catégories suivant leur origine : les eaux usées industrielles, de ruissellement et domestiques. Il est important de déterminer la provenance des eaux usées afin d'identifier les contaminants contenus et potentiellement rejetés dans l'environnement. Les eaux industrielles constituent les eaux usées provenant d'établissements utilisés à des fins commerciales ou industrielles tels que des usines, des installations agro-alimentaires ou mécaniques, des garages. Elles contiennent au moins une substance classée dangereuse par la directive n°91/271/CEE du 21 mai 1991 telles que des métaux lourds, des hydrocarbures, des déchets radioactifs, des solvants, ou des composés actifs de produits phytosanitaires. Les eaux dites domestiques sont les eaux usées issues des habitats ou établissements résidentiels produites essentiellement par le métabolisme humain et les activités ménagères. Et les eaux de ruissellement ou les eaux pluviales représentent les eaux issues du lessivage des parkings, voies de circulation, toitures, terrasses, zones agricoles, qui se chargent de résidus et de contaminants, variables d'un site à l'autre, jusqu'au déversement dans le milieu naturel.

### 1.2. Les eaux usées domestiques

#### 1.2.1. Composition

A la différence des eaux pluviales et industrielles, les eaux usées domestiques (EUD) sont dépourvues de métaux lourds, d'hydrocarbures et de déchets radioactifs. Elles sont uniquement issues de l'usage personnel de l'eau. Les caractéristiques des EUD dépendent de leurs sources d'émission à l'échelle de l'habitation (Boutin et Eme, 2016). Il existe deux types d'EUD : les eaux dites « noires » et les eaux dites « grises » (**Figure 1**). Les eaux usées vannes ou « noires » proviennent des toilettes, elles contiennent les excréments humains (urines, fèces), les eaux de chasse, le papier toilette et les résidus des produits ménagers. Elles sont riches en matières organiques et en microorganismes dont des bactéries potentiellement pathogènes. Les eaux

ménagères dites « grises » proviennent des activités liées à la nourriture et au nettoyage (évier de cuisine, lave-vaisselle, machine à laver) et de celles liées aux soins personnels (vasques de salle de bain, douche, baignoire). Ces eaux « grises » sont riches en graisses, détergents, débris organiques et solvants (Eme et Boutin, 2015).



**Figure 1.** Classification des eaux usées domestiques (Eme et Boutin, 2015).

Les eaux usées domestiques sont composées de :

- Matières en suspension (MES) qui sont des matières solides de 1  $\mu\text{m}$  à 1 cm, insolubles dans l'eau, de natures organique ou minérale provenant principalement des eaux dites « noires ». Le papier toilette représente 50 % des MES (Eme et Boutin, 2015). Si elles sont directement rejetées dans le milieu aquatique à de fortes concentrations, les MES peuvent entraîner des dépôts boueux et des conditions anaérobies modifiant la composition des communautés benthiques.
- Matières organiques biodégradables (MOB), riches en Carbone (C), composées des protéines, détergents, graisses et carbohydrates, issues principalement des eaux dites « noires » (Eme et Boutin, 2015). Les MOB représentent un réservoir important de C pour le développement des organismes vivants. En excès, elles peuvent également induire des conditions anaérobies, néfastes pour certaines communautés du sol, de lac ou de rivière (Henze *et al.*, 2001).

- Nutriments : Azote (N), Phosphore (P), sous formes organique ou minérale. Ils sont indispensables au métabolisme biologique de la majorité des organismes vivants pour se reproduire et croître. L'azote, sous forme d'azote organique, d'ammonium et de sels à base de nitrate, est principalement issu des eaux de salle de bain et toilettes, mais il peut aussi provenir de l'utilisation des produits ménagers (Tjandraatmadja *et al.*, 2010). Typiquement, les EUD contiennent entre 20 et 85 mg.L<sup>-1</sup> d'azote total (Kim *et al.*, 2006). Le phosphore, sous la forme de dépôts de phosphate minéral et de phosphate tricalcique, est retrouvé dans les eaux de lessive en grande quantité mais aussi dans les eaux de toilettes et de cuisine (Tjandraatmadja *et al.*, 2010). L'excès de N et P dans les rejets d'eaux usées conduit à des proliférations excessives d'algues, donc à des phénomènes d'eutrophisation du milieu récepteur. Ceci induit une diminution de l'oxygène dissous dans l'eau et impacte les autres espèces aquatiques (Tjandraatmadja *et al.*, 2010).
- Matières inorganiques dissoutes issues des produits ménagers et des produits pour le soin personnel, comme les éléments suivants : Antimoine (Sb), Calcium (Ca), Chrome (Cr), Cobalt (Co), Fluor (F), Molybdène (Mo), Sélénium (Se), Sodium (Na) et Soufre (S). Leurs concentrations dans les eaux usées dépendent de l'utilisation des produits les contenant dans chaque ménage. Le chrome et le cobalt sont issus de toutes les sources domestiques alors que les autres éléments ne sont retrouvés que dans les eaux de lavage et de salle de bain (Ca, F, Se) ou dans les lessives et les toilettes (Mo). Ces éléments sont de plus en plus préoccupants pour les autorités de l'eau en raison de leur impact chronique sur la santé publique et l'environnement (Tjandraatmadja *et al.*, 2010). Par exemple, de fortes concentrations en Ca rejetées dans l'environnement peuvent augmenter l'absorption de Ca par les plantes et conduire à des brûlures du feuillage. Quant aux Co, Mo et Cr, ils peuvent être toxiques pour les végétaux aquatiques et terrestres. Enfin le Se, comme tous les autres oligoéléments, est un élément essentiel à faibles concentrations mais peut être toxique pour les animaux et les plantes à fortes doses (Tjandraatmadja *et al.*, 2008). Bien que les métaux lourds soient généralement issus des eaux industrielles, les eaux usées domestiques peuvent contenir ces éléments traces inorganiques apportés par les canalisations de distribution d'eaux (Manganèse (Mn), Plomb (Pb), Zinc (Zn), Cuivre (Cu)) ou par les usages quotidiens (Nickel (Ni), Cadmium (Cd), Fer (Fe), Mercure (Hg)) (Eriksson *et al.*, 2010).
- Matières non classées, découvertes problématiques lors de l'assainissement des eaux depuis une dizaine d'années : les tensio-actifs, les phénols (textiles), les micropolluants

(pesticides, produits pharmaceutiques et leurs métabolites) et autres xénobiotiques organiques (parfums, conservateurs (parabènes), plastifiants, antioxydants, solvants) (Eme et Boutin, 2015). Ces composés peuvent être toxiques et générer des phénomènes de bioaccumulation (Henze *et al.*, 2001). Récemment, grâce aux avancées analytiques, de nouveaux contaminants ont été découverts dans les eaux usées, il s'agit des nanoparticules. Ce sont des agrégats atomiques ou moléculaires entre 1 et 100 nm (P. Ball, 2002) d'origine anthropique (combustion du diesel et du charbon, fumées de soudure), à différencier des nanoparticules naturelles issues des poussières volcaniques, lunaires et minérales (Ruffini Castiglione et Cremonini, 2009). Leur présence croissante dans le milieu naturel génère des préoccupations majeures sur leur devenir et leurs potentiels effets négatifs dans l'environnement, et donc leur élimination par les procédés d'assainissement (Gomes *et al.*, 2016).

- Organismes pathogènes ou non tels que les bactéries et les virus pouvant conduire à des transmissions de maladies (Eme et Boutin, 2015). D'après l'agence européenne EFSA (European Food Safety Authority), les bactéries pathogènes sont la première cause d'épidémie d'origine alimentaire (*e.g. Salmonella*), et les virus constituent la seconde source d'épidémie (EFSA, 2011).

### 1.2.2. Réglementation

#### 1.2.2.1. Caractérisation des eaux usées domestiques

Pour évaluer le niveau de pollution des EUD, plusieurs paramètres sont considérés comme la quantité de matière en suspension (MES,  $\text{mg.L}^{-1}$ ), la demande biologique en oxygène (DBO,  $\text{mg(O}_2\text{).L}^{-1}$ ), la demande chimique en oxygène (DCO,  $\text{mg(O}_2\text{).L}^{-1}$ ), et les concentrations en azote et phosphore, particulièrement si la zone recevant les rejets est sensible à l'eutrophisation. Dans le cas de rejet dans des zones de baignade (lacs, rivières, littoral marin ou océanique), la présence de germes (*Escherichia coli* et entérocoques intestinaux), témoins de contamination fécale, est aussi considérée. Les bactéries identifiées sont des indicateurs du niveau de pollution par les EUD et elles témoignent de la présence potentielle de germes pathogènes.

La DBO est la quantité de dioxygène ( $\text{O}_2$ ) nécessaire aux microorganismes aérobies pour oxyder par voie biologique les matières organiques, dissoutes ou en suspension dans l'eau. Ce paramètre constitue un bon indicateur de la teneur en matières organiques biodégradables d'une eau, il est comparé à la mesure de référence  $\text{DBO}_5$  qui correspond à la quantité d' $\text{O}_2$  consommée

au bout de 5 jours d'incubation. La DCO correspond à la quantité d'O<sub>2</sub> utilisée par les oxydants chimiques pour oxyder par voie chimique les substances organiques et minérales de l'eau.

Pour déterminer le potentiel de biodégradabilité des EUD, le rapport DCO/DBO<sub>5</sub> est considéré. Il permet d'évaluer la capacité des microorganismes à biodégrader facilement les polluants organiques en présence de nutriments. Si le rapport est faible, les matières organiques présentes sont facilement biodégradables, au contraire si le rapport est élevé, la biodégradation sera plus difficile par les microorganismes (Eme et Boutin, 2015). Un rapport DCO/DBO<sub>5</sub> inférieur à 3 permet de traiter correctement les EUD par des procédés biologiques. Sinon, ce sont des procédés chimiques ou physiques qui doivent être considérés. D'après plusieurs analyses effectuées par Eme and Boutin (2015), les urines semblent plus facilement biodégradables que les fèces qui sont plus biodégradables que les eaux ménagères. Le potentiel de biodégradation de ces eaux varie suivant leur composition.

L'équivalent-habitant (EqH) est une unité qui permet de quantifier les matières polluantes présentes dans les EUD et donc d'estimer la pollution potentielle émise par une agglomération. Il prend en compte les rejets liés à la vie quotidienne d'un habitant dans un réseau de collecte et les rejets liés au secteur économique associé, si ces derniers sont déversés dans le réseau de collecte domestique alimentant la station d'épuration. En référence à la directive n°91/271/CEE sur les eaux résiduaires urbaines du 21 mai 1991, un équivalent-habitant est défini uniquement sur un critère de flux organique, il est fixé à 1 EqH = 60 g de DBO<sub>5</sub> par jour. Il sert à harmoniser les mesures de capacité des installations d'assainissement.

#### 1.2.2.2. Réglementation des rejets d'eaux usées domestiques

La réglementation française sur la gestion des EUD repose sur la directive européenne n°91/271/CEE du 21 mai 1991 relative à la collecte, au traitement et au rejet des eaux urbaines résiduaires domestiques. Elle vise à protéger l'environnement d'une détérioration due aux rejets d'eaux usées.

Suite à la publication de cette directive, les Etats membres de l'Union Européenne ont eu l'obligation de mettre en place des systèmes de collecte et de traitement des EUD en fonction de la taille (exprimée en EqH) de chaque agglomération. Il est préconisé d'appliquer des traitements primaire et secondaire des EUD avant tout rejet dans les eaux douces. Le traitement primaire consiste à appliquer un procédé physique et/ou chimique aux eaux résiduaires urbaines

comprenant la décantation des matières solides en suspension. Le traitement secondaire quant à lui consiste à la mise en place d'un traitement biologique avec décantation secondaire. Des traitements plus efficaces peuvent être mis en place lors de rejets dans des zones dites « sensibles » aux pollutions ou à l'eutrophisation du milieu. Des analyses des EUD sont désormais effectuées par auto-surveillance par l'exploitant de la station d'épuration à la sortie du réseau de collecte et après le traitement des eaux afin de répondre aux prescriptions de la directive n°91/271/CEE complétée par les prescriptions techniques fixées par l'arrêté du 22 juin 2007 (mis à jour le 1 janvier 2016).

Après traitement, les rejets d'EUD dans le milieu naturel (rivières, estuaires, zones maritimes) sont alors possibles si les valeurs des différents paramètres sont inférieures aux concentrations maximales admissibles ou si le rendement minimal de réduction a été atteint à la sortie de la station d'épuration par rapport aux valeurs en entrée (**Tableau 1**). Ces mesures sont applicables à des dispositifs d'assainissements collectifs recevant une charge brute journalière de pollution organique supérieure à 12 kg de DBO<sub>5</sub> (agglomérations de plus de 200 EqH) mais aussi à des dispositifs non collectifs recevant une charge brute journalière de pollution organique supérieure à 1,2 kg de DBO<sub>5</sub>. Pour les rejets de bassin de lagunage dans le milieu naturel, la valeur de concentration en MES est fixée à 150 mg.L<sup>-1</sup>. Si les effluents ne peuvent pas être rejetés dans les eaux superficielles, ils peuvent être soit éliminés par infiltration dans le sol, soit réutilisés pour arroser les espaces verts ou irriguer les cultures, ceci nécessitant une phase préalable de désinfection des eaux usées traitées.

### 1.2.1. Systèmes d'assainissement et contraintes

L'assainissement des EUD a pour fonction de collecter puis épurer les eaux usées afin de les purifier des charges polluantes qu'elles contiennent avant de les rejeter dans le milieu naturel en respectant les normes de rejet en vigueur. La mise en place de systèmes d'assainissement collectifs ou non est nécessaire pour des raisons de santé publique et de préservation de l'environnement.



**Tableau 1.** Principales prescriptions relatives aux rejets d'eaux usées domestiques provenant de stations d'épuration soumises aux dispositions de la directive n°91/271/CEE du 21 Mai 1991 et de l'arrêté du 22 juin 2007, annexe I et II, complété par l'arrêté du 21 juillet 2015. Concentration maximale : objectif d'épuration ; Concentration rédhibitoire : tolérance pour une partie des analyses d'auto-surveillance.

Paramètres	Charge (kg DBO <sub>5</sub> .j <sup>-1</sup> )	Concentration maximale (rédhibitoire) (mg.L <sup>-1</sup> )	Réduction minimale (%)
<i>Prescriptions générales</i>			
<b>DBO<sub>5</sub></b>	≤ 120	35 (70)	60
	120 < C < 600	25 (50)	70
	> 600	25 (50)	80
<b>DCO</b>	≤ 120	200 (400)	60
	> 120	125 (250)	75
<b>MES</b>	≤ 120	- (85)	50
	> 120	35 (85)	90
<i>Prescriptions spécifiques aux zones sensibles à l'eutrophisation</i>			
<b>P total</b>	600 < C < 6 000	2	80
	> 6 000	1	80
<b>N total</b>	600 < C < 6 000	15	70
	> 6 000	10	70

Il existe plusieurs méthodes d'assainissement des EUD, choisies en fonction de la quantité, de la composition et de la charge de pollution des effluents, de la nature et de la surface du milieu recevant les EUD traitées et des possibilités socio-économiques de l'agglomération concernée (disponibilité de terrains, ressources financières, etc.). A ces critères, s'ajoute l'exigence de qualité des eaux en sortie du dispositif d'assainissement fixée par la réglementation française (adaptée de la directive n°91/271/CEE du 21 Mai 1991 et Arrêté du 22 juin 2007, modifié le 21 juillet 2015). La connaissance de la composition des EUD à traiter est indispensable pour adapter au mieux le système de traitement avant le rejet des EUD traitées dans l'environnement. Leur qualité et leur composition jouent un rôle significatif dans le coût du traitement et dans le devenir des effluents. De plus il est important de connaître l'origine des EUD afin de déterminer les contaminants qu'elles contiennent et définir des méthodes efficaces de protection de l'environnement (Tjandraatmadja *et al.*, 2010). Il y a 15 ans, plus de la moitié des eaux mondiales de rivières, lacs, et zones côtières étaient polluées par les eaux usées non traitées, à la fois domestiques, industrielles et issues de l'agriculture (Duncan, 2003).

Deux types de traitement sont utilisés actuellement en France pour assainir les EUD (Metcalf et Eddy, 2003) : les techniques intensives (procédés faisant appel aux stations d'épuration à

boues activées, à biofiltration, à disques biologiques, à bioréacteurs à membranes, etc.) et les techniques extensives (procédés alternatifs tels que le lagunage naturel ou la phytoépuration par exemple).

#### 1.2.1.1. Procédés intensifs

Les stations d'épuration (STEP) font partie des procédés intensifs les plus utilisés à ce jour. Ce sont des établissements recevant les eaux usées des usagers particuliers ou industriels grâce à un réseau de collecte des eaux usées. Si le réseau d'assainissement est commun, elles peuvent aussi recevoir les eaux pluviales (réseau dit unitaire). Elles réalisent l'épuration des eaux usées après plusieurs prétraitements, traitements primaires et secondaires. Suivant la qualité des eaux purifiées, elles sont enfin rejetées dans des cours d'eaux, estuaires ou zones côtières ou réutilisées en agriculture ou aquaculture (Duncan, 2003).

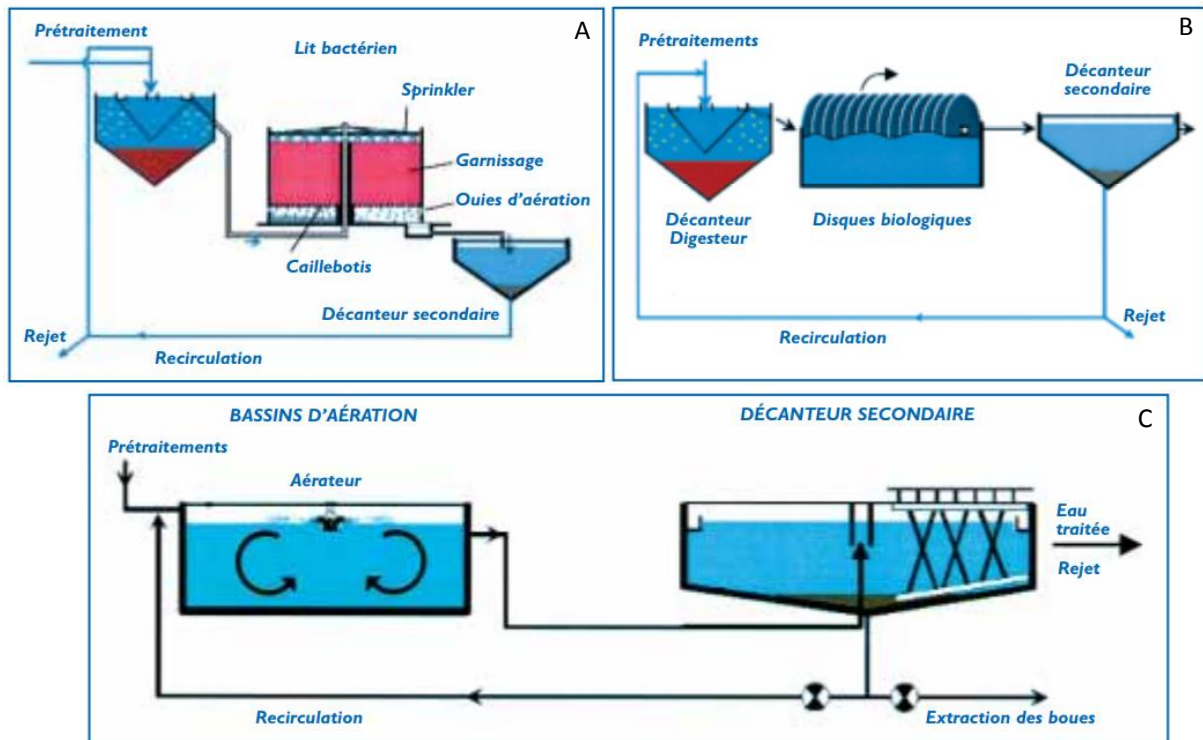
A l'entrée d'une STEP, les EUD subissent dans un premier temps un prétraitement par des opérations de dégrillage (**Figure 2**). Cette étape a pour but d'éliminer les plus gros débris solides qui gêneraient les étapes suivantes du traitement ou endommageraient les équipements. Le bassin est équipé d'un système de dégrillage composé de barreaux inclinés et de paniers perforés qui retiennent les grosses particules (6 à 40 mm pour le dégrillage, 0,5 à 6 mm pour le tamisage).

Les eaux passent ensuite dans un autre bassin pour subir les traitements primaires grâce à un système de dessablage / déshuilage. Les graviers, sables et particules minérales des eaux usées sont éliminés par décantation alors que les huiles et graisses sont flottées en surface par bullage d'air. Puis les eaux subissent une décantation qui permet d'éliminer les matières en suspension fines et en partie les matières colloïdales. Les étapes du traitement primaire ont pour objectif d'éliminer la matière organique en suspension d'au moins 50 % et de réduire la demande biologique en oxygène (DBO<sub>5</sub>) des eaux résiduaires entrantes d'au moins 20 %.



**Figure 2.** Le fonctionnement d'une station d'épuration (IRSTEA).

L'effluent subit ensuite le traitement secondaire qui améliore la qualité de l'eau par l'élimination de la matière organique dissoute dans l'eau à travers des voies biologiques et/ou physico-chimiques (Metcalf et Eddy, 2003). Les procédés biologiques permettant l'aération de l'eau sont les plus développés au niveau des STEP, ils comprennent des boues activées, des lits bactériens, des disques biologiques, ou des techniques de filtration biologique accélérée (**Figure 3**). La voie biologique fait appel aux microorganismes contenus dans l'effluent qui s'agrègent sous forme de floccs microbiens en suspension ou se fixent sur un support différent selon la technique utilisée.



**Figure 3.** Principes de fonctionnement des lits bactériens (A), des disques biologiques (B) et des boues activées (C) utilisés dans le traitement secondaire des eaux usées (Berland *et al.*, 2001).

Les microorganismes aérobies ou anaérobies assimilent la matière organique biodégradable qui leur sert de substrat de croissance et transforment les composés azotés (nitrification et dénitrification) et phosphorés (assimilation dans la biomasse) (Berland *et al.*, 2001). Le traitement secondaire se termine généralement par une étape de clarification, afin de retirer de l'eau traitée les microorganismes qui s'y sont développés. Les boues d'épuration sont ensuite valorisées par épandage dans des exploitations agricoles ou traitées dans des centres techniques spécialisés si elles ne sont pas conformes aux normes exigées pour leur épandage. La voie physico-chimique est souvent utilisée pour compléter la voie biologique n'éliminant pas suffisamment les phosphates et les MES. Elle consiste à ajouter à l'effluent des éléments qui faciliteront la coagulation (Al ou Fe) et la floculation (polymères) des matières colloïdales et la complexation et précipitation des phosphates.

Enfin les eaux usées peuvent subir un traitement tertiaire de désinfection (décontamination bactérienne des eaux par ozonation ou chloration) afin de les stocker en vue de les réutiliser pour l'agriculture ou l'entretien des zones urbaines (Berland *et al.*, 2001).

Les procédés intensifs sont efficaces pour assainir les EUD et adaptés à toutes tailles de collectivités. Ils garantissent une bonne élimination des paramètres de pollution (DBO<sub>5</sub>, DCO, MES, N) mais sont parfois très onéreux et coûteux en énergie. L'entretien des STEP et l'élimination des boues demandent beaucoup d'investissement. De plus, les systèmes intensifs ne sont pas suffisamment performants pour l'élimination des micropolluants organiques (Melvin et Leusch, 2016) et les infrastructures des STEP sont sensibles aux conditions climatiques et sont très vite altérées dans les zones humides des régions tropicales.

#### 1.2.1.2. Les procédés extensifs

Sachant que les ressources économiques sont de plus en plus restrictives pour mettre en œuvre et exploiter des infrastructures conventionnelles de traitement des EUD, des technologies alternatives, à petite échelle et innovantes, se sont progressivement développées depuis les années 80 : filtres plantés, lagunages, filtres à sables, filtres biologiques (Wang *et al.*, 2017). Ces dispositifs sont efficaces et moins onéreux, ils s'adaptent aux conditions climatiques des régions tropicales (comme les départements français d'outremer) et au contexte socio-économique des pays en voie de développement.

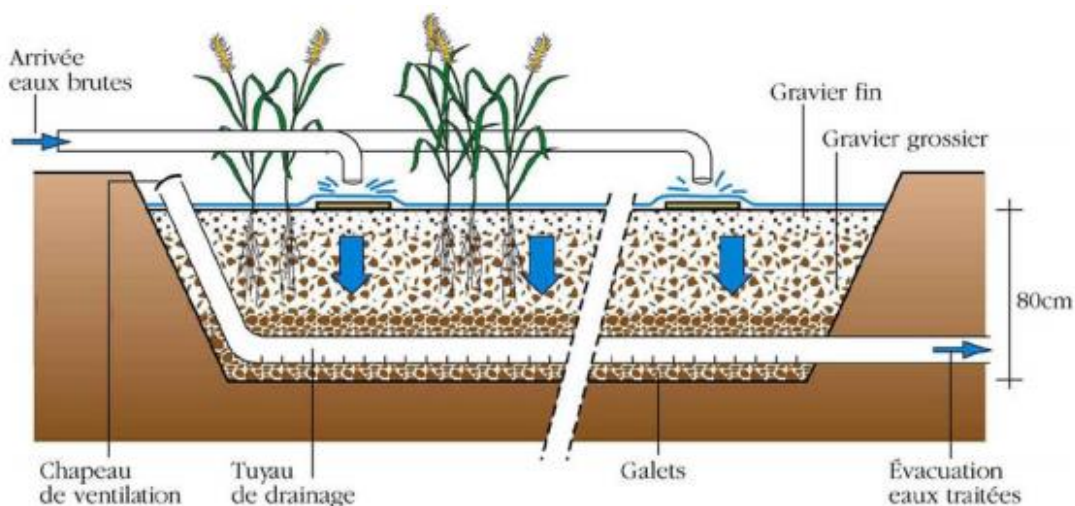
Les techniques dites extensives réalisent l'épuration des EUD à l'aide de cultures fixées sur support fin ou de cultures libres. Les microorganismes utilisent l'oxygène produit lors de la photosynthèse par les végétaux ou les algues. La plupart de ces techniques fonctionnent sans électricité, excepté pour le lagunage aéré pour lequel un apport d'énergie est nécessaire pour alimenter les aérateurs (Berland *et al.*, 2001). En revanche elles ne sont adéquates que pour des petites et moyennes collectivités inférieures à 2000 EqH (collectivités dont la charge journalière à traiter est inférieure à 120 kg DBO<sub>5</sub>.j<sup>-1</sup> et pour lesquelles la réglementation sur les rejets est moins stricte).

#### **Les techniques à cultures fixées sur support fin**

L'infiltration-percolation sur sable consiste à épurer les EUD par filtration biologique aérobie sur un milieu granulaire fin (Metcalf et Eddy, 2003). Les EUD sont distribuées dans chaque unité d'infiltration à raison de plusieurs centaines de litres par m<sup>2</sup> de massif filtrant et par jour. Ce système fournit des rendements efficaces de réduction des paramètres de pollution (DBO<sub>5</sub>, DCO et MES), la nitrification est importante mais la dénitrification est faible. Le phosphore est

fortement éliminé dans les 4 premières années d'utilisation puis l'abattement devient négatif. Ce système nécessite un ouvrage de décantation primaire efficace avant distribution des EUD dans le système filtrant. De plus le risque de colmatage par les boues est élevé donc cela demande un entretien régulier de l'installation (Berland *et al.*, 2001).

Les filtres plantés à écoulement vertical sont des systèmes conçus pour utiliser les fonctions naturelles de la végétation, les capacités de filtration du sol (gravier, argile, sable) et la biodégradation aérobie de la matière organique par les microorganismes fixés sur les particules du sol (Paulus, 2011; Wang *et al.*, 2017). Ces structures sont accompagnées de végétaux plantés tels que des roseaux qui permettent d'aérer le massif filtrant et d'éviter le colmatage par les boues grâce à leurs rhizomes. Les EUD sont réparties directement sur les filtres sans décantation préalable, elles percolent ensuite verticalement à travers trois couches successives de filtres de granulométrie croissante (**Figure 4**).



**Figure 4.** Principe de fonctionnement des filtres plantés verticaux (Berland *et al.*, 2001).

Les eaux sont alors drainées par traitement physique (filtres), chimique (adsorption, complexation) et biologique (microorganismes à la surface du sol) (Berland *et al.*, 2001). Généralement, le procédé est constitué de deux étages de filtration, avec au moins deux filtres en parallèle par étage (périodes d'alimentation et de repos). Dans les filtres plantés à écoulement horizontal, les eaux usées sont distribuées latéralement sur les différents filtres qui sont immergés et s'écoulent ensuite dans un sens principalement horizontal à travers le substrat

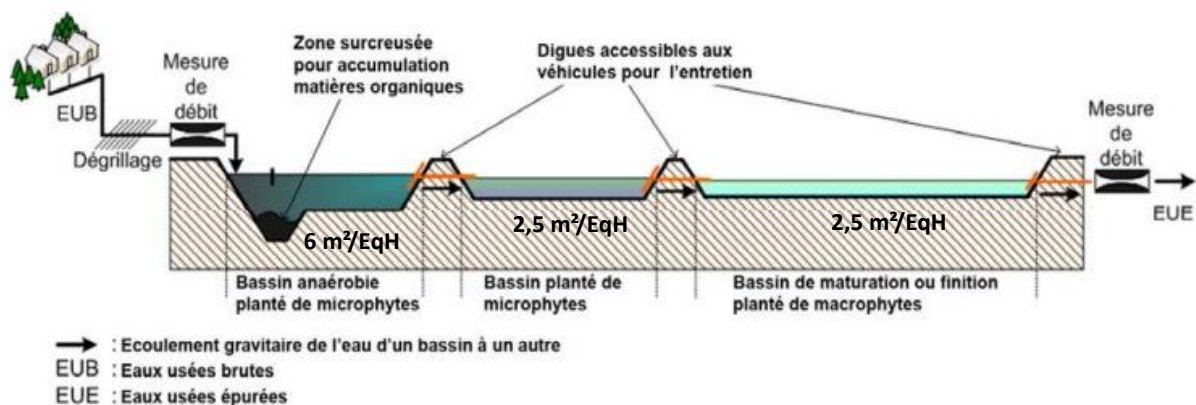


(Paulus, 2011). Les mécanismes utilisés par les microorganismes sont principalement anaérobies favorisant une bonne élimination de l'azote par dénitrification.

Les filtres plantés ont l'avantage de présenter des coûts d'exploitation et de main d'œuvre faibles, leur efficacité d'élimination des polluants est élevée. En raison de ces avantages et du bon potentiel de réutilisation de l'eau et des nutriments, les filtres plantés ont été reconnus comme une option de gestion durable des eaux usées (Wang *et al.*, 2017). De plus, ce système offre à la faune sauvage un refuge. Cependant, leur utilisation pour des agglomérations supérieures à 2000 EqH reste difficile à mettre en place et ces installations nécessitent des surfaces au sol élevées (2 m<sup>2</sup> de filtre par EqH).

### Les techniques à cultures libres

Le lagunage naturel consiste en un écoulement gravitaire des EUD, prétraitées par un dégrilleur, à travers différents bassins, appelés « lagunes », étanches, peu profonds et disposés en série (en général 3 bassins) (**Figure 5**). Le temps de séjour dans l'ensemble des lagunes est de minimum 60 jours. Plus le nombre de bassin est important, plus la performance d'épuration des EUD est élevée.



**Figure 5.** Principes de fonctionnement du lagunage naturel (IRSTEA).

Ce système utilise les capacités de filtration et d'autoépuration des microorganismes, des algues et des végétaux aquatiques. Le mécanisme central repose alors sur la photosynthèse et la dégradation de la matière organique par les microorganismes aérobies ou anaérobies. La couche supérieure d'eau exposée à la lumière se compose d'algues planctoniques ou « microphytes » qui produisent de l'oxygène nécessaire aux bactéries aérobies. Et en retour les bactéries

produisent du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) et des sels minéraux permettant aux algues de se développer. Dans les couches plus profondes des lagunes (au-delà de 1,2 m), non exposées à la lumière, les bactéries anaérobies prennent le relais en dégradant la matière organique et inorganique soluble et insoluble qui décante de la sédimentation de la matière organique des couches supérieures (Moletta, 2011). Du  $\text{CO}_2$  et du méthane ( $\text{CH}_4$ ) sont alors produits. Chaque bassin joue un rôle dans l'épuration des EUD, le premier permet l'abattement de la charge polluante carbonée, le second est responsable de l'abattement du phosphore et de l'azote et le troisième affine le traitement ou assure le traitement si un dysfonctionnement d'un des deux autres apparaît (Berland *et al.*, 2001).

Le lagunage naturel assure une réduction de 70 % de la pollution organique mais n'est pas aussi performant que le système des filtres plantés. Les performances sont accélérées en été par la stimulation de croissance des communautés microbiennes lors de l'augmentation de la température (Wang *et al.*, 2017). Les boues formées interviennent dans les processus, donc leur évacuation n'est possible qu'après 5 à 10 ans de formation mais nécessaire pour restaurer les conditions initiales qui permettent de forts abattements en phosphore. L'exploitation de ce système est simple et peu onéreuse, mais les performances des lagunes chutent sensiblement si le curage des bassins n'est pas réalisé régulièrement. De plus le lagunage demande une surface au sol très importante (11  $\text{m}^2$  par EqH).

Le lagunage à macrophytes peut être installé à la suite d'un lagunage naturel en tant que traitement tertiaire pour améliorer ses performances de traitement des EUD. Les effluents épurés ne sont pas directement rejetés dans le milieu naturel, ce système assure une transition avant le rejet dans l'environnement tout en reproduisant les zones humides naturelles.

Enfin le lagunage aéré se compose de seulement 2 bassins dont le premier est oxygéné par un système d'aération de surface comme pour le système des boues activées (Metcalf et Eddy, 2003). A la différence avec les boues activées, le lagunage aéré ne présente pas d'extraction des boues en continu et de recirculation dans le bassin aéré (Berland *et al.*, 2001).

Suivant le type de pollution, les performances d'épuration des techniques extensives varient et peuvent être moins efficaces que les procédés classiques. En revanche, l'atout paysage et nature est apporté seulement par les systèmes extensifs, ces structures présentent de meilleures qualités paysagères et attirent des espèces appartenant à la faune aquatique (*e. g.* oiseaux).



### 1.2.1.3. Contraintes de l'assainissement des EUD

Chaque système d'assainissement a ses avantages et ses inconvénients mais l'ensemble des procédés intensifs et extensifs sont soumis à des contraintes sur le type de milieu receveur, la capacité d'infiltration de son sol, et les conditions climatiques. La réglementation européenne impose une qualité précise des EUD en sortie des structures d'assainissement afin de protéger l'environnement. Elles sont souvent soumises à un traitement tertiaire avant les rejets, voire un traitement plus rigoureux supplémentaire lorsque le milieu receveur est considéré comme étant une zone sensible par la directive n°91/271/CEE. Suivant le type de milieu récepteur, les conséquences d'un rejet insuffisamment épuré sont variables et peuvent conduire à une augmentation du risque d'eutrophisation.

Les zones sensibles sont des masses d'eau douces telles que des lacs naturels ou des masses d'eaux estuariennes ou côtières, considérées comme eutrophes avant tout rejet ou pouvant rapidement devenir eutrophes avec l'apport des rejets d'eaux sans mesure de protection. Si le cas se présente, il convient de renforcer les traitements des EUD avant le rejet dans ces zones sensibles. Par exemple il est nécessaire d'éliminer l'azote et/ ou le phosphore des EUD lors de rejets, provenant de grandes agglomérations, dans des milieux où les échanges d'eaux sont faibles (cours d'eau, baies fermées, certains estuaires et zones côtières). Les eaux douces de surface destinées au captage d'eau potable sont aussi considérées comme des zones réceptrices sensibles. En revanche les mesures de dépollution sont moins drastiques pour des milieux receveur à forts échanges d'eau ou pour des masses d'eau marines. Dans ces zones, le risque d'eutrophisation est faible, ainsi que le risque d'altération de l'environnement.

D'après l'arrêté du 22 juin 2007, si les effluents traités sont destinés à être infiltrés, l'aptitude des sols à l'infiltration est établie par une étude hydrogéologique qui détermine l'impact de l'infiltration sur les eaux souterraines et donc le dimensionnement et les caractéristiques du dispositif de traitement avant infiltration qui doit tenir compte des aptitudes du sol à l'infiltration des eaux traitées. Des mesures sont prises pour limiter les risques sur la population et des dispositions sont prises pour contrôler la qualité des effluents traités. Par exemple, afin de mesurer le potentiel d'infiltration de zones humides telles que des mangroves et donc le potentiel épuratoire de ce type de milieu récepteur, un indice de capacité de résorption de l'eau (CRE) a été créé (Herteman, 2010). Cet indice CRE prend en compte les capacités d'infiltration du sédiment, l'évapotranspiration par la végétation et la bioturbation du sol induite par la faune. Il permet de déterminer le volume d'eaux à résorber par jour. Les capacités d'infiltration d'un

sol dépendent du type de végétaux présents sur la zone réceptrice, de la nature et de la granulométrie du substrat, ainsi que de la faune bioturbatrice présente.

Les conditions climatiques ont un rôle majeur sur l'efficacité et la maintenance du système d'assainissement. En effet les infrastructures des STEP ne sont pas adaptées aux milieux tropicaux où le pourcentage d'humidité de l'air dépasse 80 %. De plus dans les zones insulaires ou côtières, l'air marin riche en sel accentue la corrosion des structures métalliques. Les filtres plantés en revanche sont adéquats dans ce type de régions mais ne sont pas facilement adaptables dans des régions où le climat est froid (Wang *et al.*, 2017). Les procédés d'élimination des polluants, tels que la sédimentation, la filtration, les précipitations, la volatilisation, l'absorption des plantes et les divers procédés microbiens, sont généralement influencés directement et/ou indirectement par les différentes conditions environnementales internes et externes telles que les températures (Stottmeister *et al.*, 2003). De même l'absorption des nutriments par les plantes et la transformation microbienne des composants des eaux usées dans les zones humides sont directement et indirectement affectées par les conditions climatiques. Par exemple, une température basse freine les activités microbiennes et réduit la croissance bactérienne, ce qui entraîne une faible efficacité de purification (Wang *et al.*, 2017).

## 2. L'écosystème mangrove

### 2.1. Définition, sensibilité et rôles

#### 2.1.1. Définition et localisation des mangroves

Les mangroves sont des forêts de vasières uniques, considérées comme des écosystèmes écotones, permettant le lien entre les milieux terrestres et marins. Situées dans la zone de balancement des marées, la zone intertidale, elles sont colonisées par des arbres spécifiques, les palétuviers, capables de croître en présence d'eau douce et/ou d'eau de mer. Elles sont aussi composées de palmiers, d'épiphytes et de fougères (Tomlinson, 2016). Les végétaux constituant la mangrove sont caractérisés par une forte tolérance aux eaux salées et saumâtres (Blasco, 1991; Spalding *et al.*, 1997).

Les mangroves sont retrouvées uniquement au niveau des latitudes tropicales et subtropicales (principalement entre 30°N et 30°S), dans les zones littorales peu profondes et abritées de l'énergie des vagues, le long des deltas fluviaux, des lagunes, des îles et des estuaires (Thom *et al.*, 1984). Leur développement nécessite une température moyenne supérieure à 20°C durant

le mois le plus froid de l'année, une amplitude thermique inférieure à 10°C et une saison sèche d'une durée inférieure à 7 mois (Duke *et al.*, 1998a). De plus, la croissance des mangroves est favorisée par un climat humide tropical, caractérisé par de fortes précipitations qui entraînent la formation de bancs de vase et sédiments propices au développement de palétuviers le long des côtes (Christensen, 1982). Les mangroves sont cependant absentes de certaines côtes ouest de continents de l'hémisphère sud car elles sont soumises à des courants froids remontant vers l'Equateur (Duke, 2006). Bien que les conditions environnementales sont favorables, elles sont absentes de certaines îles du Pacifique centre (Allen, 1998) et à l'inverse elles se développent à des latitudes plus élevées au sud comme dans le sud-est de l'Australie et le nord de la Nouvelle Zélande (38°S) (Duke *et al.*, 1998b).

Actuellement les mangroves s'étendraient sur près d'un quart des côtes mondiales et représenteraient 0,4 % des forêts du monde et 0,7 % des forêts tropicales. D'après les dernières estimations et selon la techniques utilisée en 2014, l'ensemble des mangroves couvriraient 81 000 à 84 000 km<sup>2</sup>, réparties sur environ 110 pays et territoires (**Figure 6**) (Spalding *et al.*, 2010; Giri *et al.*, 2011; Hamilton *et Casey*, 2016).



**Figure 6.** Répartition des mangroves dans le monde. Modifié d'après Giri *et al.* (2011).

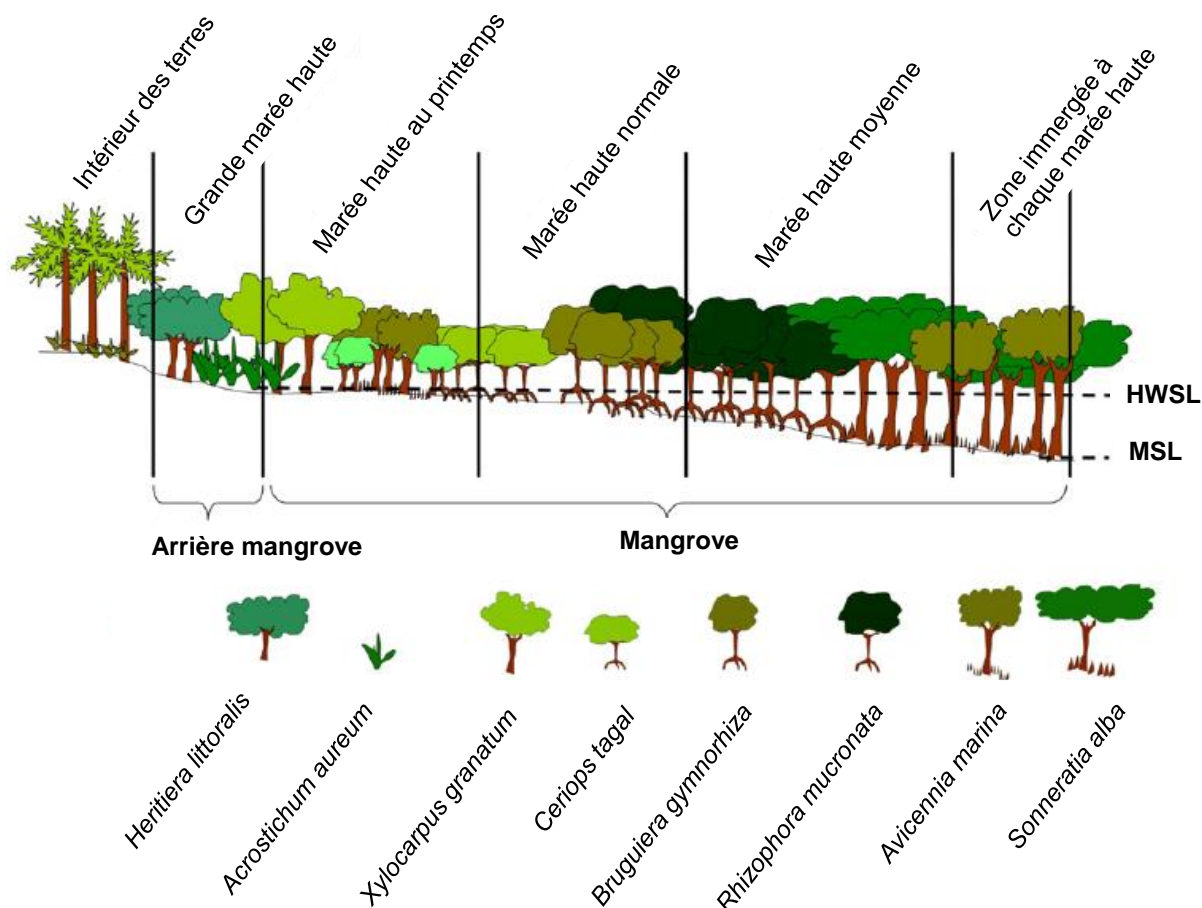
Selon l'étude de Giri *et al.* (2011), 75 % des mangroves du monde sont étendues sur une quinzaine de pays seulement dont 42 % en Asie, 20 % en Afrique et 15 % en Amérique du Nord et centrale. En 2014, les principales zones de mangroves se trouvaient au niveau des côtes

indonésiennes (23 143 km<sup>2</sup>), brésiliennes (7 663 km<sup>2</sup>), australiennes (3 315 km<sup>2</sup>), mexicaines (2 985 km<sup>2</sup>) et malaisiennes (4 691 km<sup>2</sup>) et représentaient 50 % des mangroves du monde (Hamilton et Casey, 2016).

Les mangroves sont constituées de quatre compartiments majeurs en interaction permanente : deux compartiments abiotiques, l'eau et les sédiments, et deux compartiments biotiques, la végétation et la faune. Le compartiment végétation est le compartiment principal des mangroves, il est composé de peu d'espèces d'arbres mais spécifiques de cet habitat caractérisant les forêts de mangrove. Les palétuviers stabilisent le substrat vaseux et favorisent le dépôt de matières en suspension. Le compartiment faune est largement plus diversifié que le compartiment végétal, il est composé d'espèces aquatiques, d'insectes, d'oiseaux et principalement d'espèces liées aux sédiments. Ce sont des espèces dites ingénieurs ayant un rôle indispensable dans le fonctionnement global des mangroves (Lee, 1998) comme les crabes et les espèces appartenant à la méiofaune. Ces organismes facilitent la décomposition de la matière organique et l'aération des sédiments (Kristensen, 2008). Le compartiment sédiment soutient les autres compartiments de la mangrove, il est principalement défini par la présence des microorganismes. Ce sont les principaux acteurs des processus biogéochimiques, ils permettent le recyclage de la matière organique. Ils sont fortement influencés par la salinité, la température, la teneur des sédiments en oxygène, le pH, le potentiel redox et la composition des sédiments. Enfin, le compartiment eau permet les flux de matière entre les différents compartiments de la mangrove grâce à l'écoulement des eaux provenant des terres (eau douce) et de la marée (eau salée).

### 2.1.2. Zonation des mangroves

L'observation de la distribution spatiale des différentes espèces de palétuviers dans une mangrove révèle une très forte zonation, les différentes espèces ayant tendance à occuper des espaces différents avec peu de chevauchement (**Figure 7**).



**Figure 7.** Représentation schématique de la zonation caractéristique d'une mangrove de Zanzibar en vue transverse, répartition des différentes espèces de palétuviers de l'arrière mangrove au front de mer. Le niveau moyen de la mer (NMM) et le plus haut niveau atteint par la mer au printemps (HNM) sont indiqués par des traits noirs pointillés. Modifié d'après Punwong et al. (2013).

Les espèces de palétuviers sont organisées en bandes de végétation arrangées en fonction de la topologie du terrain, de la hauteur des marées et de la durée d'immersion des palétuviers dans l'eau de mer (Robertson *et al.*, 1992). Elles sont aussi distribuées selon les gradients environnementaux tels que la salinité du substrat, la composition du sol et de l'eau de surface, la disponibilité en nutriments et la température (Ball, 1998). Ces facteurs affectent directement la santé des palétuviers ou sont des ressources nécessaires pour leur croissance (Austin, 1985). De plus les interactions entre les plantes et les animaux et la compétition entre espèces peuvent influencer la disponibilité en nutriments et affecter la dynamique des mangroves différemment le long du gradient de balancement des marées (Ball, 1998). Les mangroves sont souvent séparées de l'intérieur des terres par une zone appelée le tanne. Il s'agit de vastes étendues de

sédiments à la lisière des mangroves, dénudées ou couvertes de végétation rase, ponctuées d'arbres morts ou rabougris. Cette zone est inondée uniquement lors des grandes marées hautes et est couverte d'inflorescences salines lors des périodes sèches. Elle fait partie de la zone appelée « arrière mangrove » composée d'arbres peu soumis aux marées tels que les *Heritiera* et les *Xylocarpus*, elle peut aussi être constituée d'*Avicennia*.

Les espèces vivant dans un tel environnement, à l'interface entre la terre et la mer, sont capables de survivre dans des conditions extrêmes en constante fluctuation. Peu d'espèces peuvent s'adapter à cet environnement instable, boueux et salé, et donc la diversité des espèces végétales y est faible (Feller *et al.*, 2010). Actuellement 73 espèces et hybrides ont été recensés parmi la végétation des mangroves du monde et les plus fortes diversités ont été trouvées en Asie du sud et en Australie (Spalding *et al.*, 2010). Ces espèces ont développé des stratégies similaires de survie et de reproduction spécifique à ce milieu (Spalding *et al.*, 1997). Les palétuviers ont adopté des solutions telles que le développement de systèmes racinaires particuliers pour résister à de fortes salinités (genres *Avicennia*, *Aegiceras*) ou pour s'adapter aux conditions anoxiques des sédiments (genre *Rhizophora*) (Feller *et al.*, 2010).

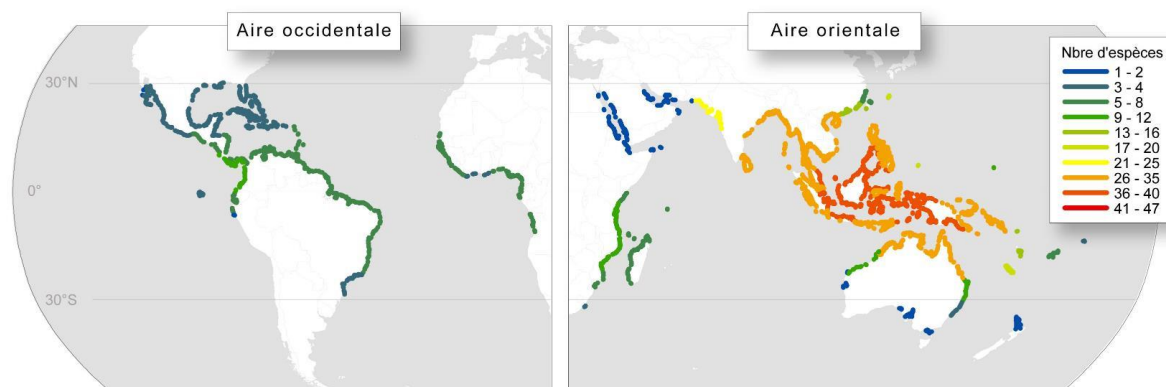
La structure des mangroves ne repose pas sur des zonations types, la répartition des espèces dépend exclusivement des conditions du milieu. Certaines espèces sensibles à de forte salinité telles que les *Rhizophora* vont préférer le front de mer alors que d'autres telles que les *Avicennia* tolèrent ces conditions et peuvent alors se développer en arrière mangrove (Tomlinson, 2016). Néanmoins la colonisation des nouveaux dépôts sédimentaires fait appel à une mise en place successive et temporelle des espèces végétales. Echezuria *et al.* (2002) ont décrit par exemple la colonisation de bancs de sédiments dans le delta de l'Orénoque, un fleuve du Vénézuéla. Dans un premier temps, des espèces herbacées et des graminées spécifiques de zones salées s'implantent puis *Laguncularia racemosa*, sous forme d'arbuste ou d'arbre, se développe pour former la canopée. Puis sous la canopée, *Avicennia germinans* s'établit au bout d'un an ou deux et dépasse ensuite la canopée au bout de 5 à 10 ans. Enfin après la disparition naturelle de certains *Avicennia* par sénescence ou lors de tempêtes, des *Rhizophora*, tolérants à l'ombrage des autres espèces, s'intercalent sous la canopée.

## 2.2. Composition de l'écosystème mangrove

### 2.2.1. Compartiment végétation

#### 2.2.1.1. Diversité des espèces végétales de mangrove

La distribution des espèces végétales de mangroves se répartit en deux aires biogéographiques, de composition et de richesse différente : l'aire Indo-Pacifique-Ouest ou l'aire orientale et l'aire Atlantique-Pacifique-Est ou l'aire occidentale (**Figure 8**). L'aire orientale, avec une soixantaine d'espèces différentes (50 espèces dites « vraies », qui ne sont présentes que dans les écosystèmes mangrove) s'étend de l'Afrique de l'Est, en passant par l'Asie, jusqu'aux îles du Pacifique Ouest et l'aire occidentale avec seulement une dizaine d'espèces différentes (8 espèces vraies) comprend les Amériques, l'Afrique centrale et de l'Ouest (Hoekstra *et al.*, 2010; Tomlinson, 2016).



**Figure 8.** Répartition mondiale des espèces végétales de mangrove appartenant aux deux aires biogéographiques : l'aire orientale (Indo-Pacifique-Ouest) et l'aire occidentale (Atlantique-Pacifique-Est). Le gradient de couleur indique la richesse des espèces végétales dans le monde (Fromard *et al.*, 2018).

D'après la carte, le centre global de biodiversité se situe clairement en Asie du Sud et du Sud-Est, quelques zones minoritaires fortement diversifiées se distinguent également dans l'Ouest de l'Océan Indien (près de Madagascar) et dans le sud de l'Amérique centrale (près du Costa Rica). Globalement la diversité en mangrove diminue en s'éloignant des tropiques. Il n'existe pas de chevauchement entre les deux aires biogéographiques, la dispersion des espèces entre les deux zones de mangroves est limitée par des barrières terrestres (continent africain) et de



grandes étendues d'eaux (Océan Pacifique). Seuls les trois genres *Avicennia*, *Rhizophora* et *Acrostichum* sont partagés entre les deux aires biogéographiques et une seule espèce végétale est commune aux deux régions, il s'agit d'une fougère de mangrove nommée *Acrostichum aureum* (Duke, 2006).

Les espèces végétales trouvées en mangrove n'ont aucun lien phylogénétique entre elles ; elles forment seulement un groupe écologique constitué de 20 familles taxonomiques différentes (**Tableau 2**).

**Tableau 2.** Répartition mondiale des 73 espèces végétales de mangrove et hybrides séparés par famille entre l'aire biogéographique Indo-Pacifique-Ouest et l'aire biogéographique Atlantique-Pacifique-Est (Spalding *et al.*, 1997, 2010; Duke, 2006). Les espèces majoritaires en mangrove sont représentées en gras.

Espèces de l'aire Indo-Pacifique Ouest			
Famille	Espèce	Famille	Espèce
Acanthaceae	<i>Acanthus ebracteatus</i>	<b>Rhizophoraceae</b>	<b><i>Bruguiera cylindrica</i></b>
	<i>Acanthus ilicifolius</i>		<b><i>Bruguiera exaristata</i></b>
Arecaceae	<i>Nypa fruticans</i>		<b><i>Bruguiera gymnorhiza</i></b>
<b>Avicenniaceae</b>	<b><i>Avicennia alba</i></b>		<b><i>Bruguiera hainesii</i></b>
	<i>Avicennia integra</i>		<b><i>Bruguiera parviflora</i></b>
	<i>Avicennia marina</i>		<b><i>Bruguiera sexangula</i></b>
	<i>Avicennia officinalis</i>		<i>Bruguiera x rhynchoptala</i>
	<i>Avicennia rumphiana</i>		<b><i>Ceriops australis</i></b>
Bignoniaceae	<i>Dolichandrone spathacea</i>		<b><i>Ceriops decandra</i></b>
Bombacaceae	<i>Camptostemon philippinense</i>		<b><i>Ceriops tagal</i></b>
	<i>Camptostemon schultzei</i>		<b><i>Kandelia candel</i></b>
Caesalpiniaceae	<i>Cynometra iripa</i>		<b><i>Kandelia obovata</i></b>
<b>Combretaceae</b>	<b><i>Lumnitzera littorea</i></b>		<b><i>Rhizophora apiculata</i></b>
	<b><i>Lumnitzera racemosa</i></b>		<b><i>Rhizophora mucronata</i></b>
	<i>Lumnitzera x rosea</i>		<b><i>Rhizophora samoensis</i></b>
Ebenaceae	<i>Diospyros littorea</i>		<b><i>Rhizophora stylosa</i></b>
Euphorbiaceae	<i>Excoecaria agallocha</i>		<i>Rhizophora x lamarckii</i>
	<i>Excoecaria indica</i>		<i>Rhizophora x neocaledonica</i>



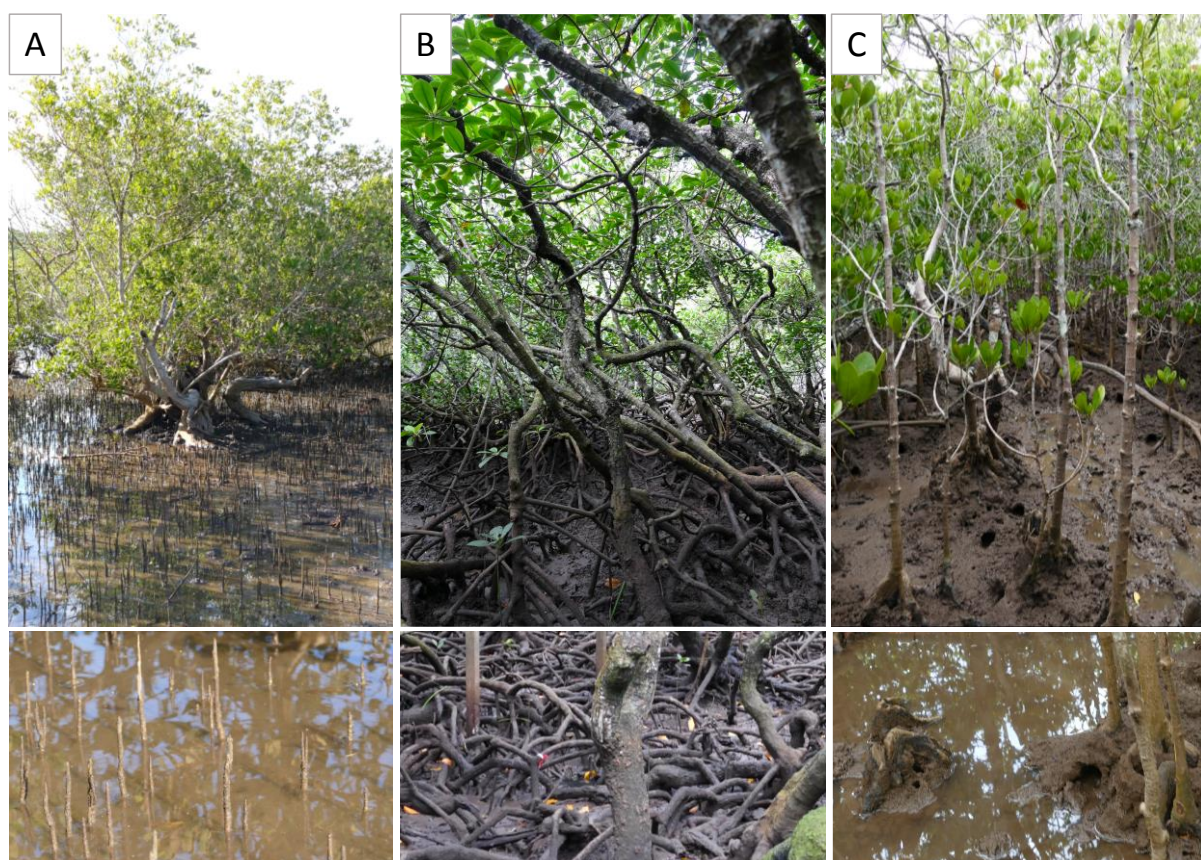
Lythraceae	<i>Pemphis acidula</i>		<i>Rhizophora x selala</i>
<b>Meliaceae</b>	<i>Aglaia cucullata</i>	Rubiaceae	<i>Scyphiphora hydrophylacea</i>
	<i>Xylocarpus granatum</i>	<b>Sonneratiaceae</b>	<i>Sonneratia alba</i>
	<i>Xylocarpus moluccensis</i>		<i>Sonneratia apetala</i>
Myrsinaceae	<i>Aegiceras corniculatum</i>		<i>Sonneratia caseolaris</i>
	<i>Aegiceras floridum</i>		<i>Sonneratia griffithii</i>
Myrtaceae	<i>Osbornia octodonta</i>		<i>Sonneratia lanceolata</i>
Plumbaginaceae	<i>Aegialitis annulata</i>		<i>Sonneratia ovata</i>
	<i>Aegialitis rotundifolia</i>		<i>Sonneratia x gulngai</i>
Pteridaceae	<i>Acrostichum aureum</i>		<i>Sonneratia x hainanensis</i>
	<i>Acrostichum danaeifolium</i>		<i>Sonneratia x urama</i>
	<i>Acrostichum speciosum</i>	Sterculiaceae	<i>Heritiera fomes</i>
			<i>Heritiera globosa</i>
			<i>Heritiera littoralis</i>

#### Espèces de l'aire Atlantique-Pacifique-Est

Famille	Espèce	Famille	Espèce
<b>Avicenniaceae</b>	<i>Avicennia bicolor</i>	<b>Pellicieraceae</b>	<i>Pelliciera rhizophorae</i>
	<i>Avicennia germinans</i>	Preridaceae	<i>Acrostichum aureum</i>
	<i>Avicennia schaueriana</i>	<b>Rhizophoraceae</b>	<i>Rhizophora mangle</i>
Bignoniaceae	<i>Tabebuia palustris</i>		<i>Rhizophora racemosa</i>
Caesalpiniaceae	<i>Mora oleifera</i>		<i>Rhizophora x harrisonii</i>
<b>Combretaceae</b>	<i>Conocarpus erectus</i>		
	<i>Laguncularia racemosa</i>		

Les mangroves sont composées d'espèces d'arbres, les palétuviers, d'arbustes, de buissons, de quelques fougères et d'une seule espèce de palmier. Les palétuviers les plus abondants et les plus représentatifs de l'écosystème mangroves appartiennent au genre *Rhizophora*, et sont fréquemment appelés les palétuviers rouges. Ils sont caractérisés par des racines échasses qui symbolisent les mangroves (**Figure 9**). Une dizaine d'espèces différentes sont recensées dans ce genre, dont certaines telles que *Rhizophora apiculata*, *R. mucronata*, *R. stylosa* et *R. mangle* occupent les aires de répartition mondiale les plus étendues (Spalding *et al.*, 2010). L'espèce *R. mangle* est particulièrement suivie pour ses capacités de développement dans des zones de reconstruction de mangrove où cette espèce est plantée dans le but de stabiliser les côtes

sédimentaires. Peu d'espèces dites introduites peuvent se stabiliser et se propager aussi efficacement (Allen, 1998). Le genre *Rhizophora* est représenté sur l'ensemble des continents et dans la quasi-totalité des mangroves. Ces arbres atteignent généralement des hauteurs entre 4 et 10 m (Floride, Mexique, Kenya, Madagascar, Thaïlande, Sri-Lanka) mais dans des mangroves anciennes bien conservées, ils peuvent atteindre jusqu'à 29 m de hauteur (Malaisie, Indonésie, Guyane française) (Komiya *et al.*, 2008).



**Figure 9.** Exemples de structures racinaires de palétuviers : pneumatophores d'un spécimen d'*Avicennia marina* (A), racines échasses de *Rhizophora mucronata* (B), racines genouillées d'un *Ceriops tagal* (C).

Le genre *Avicennia* constitue le second genre de palétuvier le plus représenté dans la quasi-totalité des mangroves. Les *Avicennia* sont communément appelés « palétuviers gris » ou « palétuviers blancs » en raison de la couleur blanchâtre (cristaux de sel) de la face inférieure de leurs feuilles. Ces arbres sont caractérisés par des formations racinaires particulières appelées pneumatophores (**Figure 9**). Les espèces occupant le plus de surface sur le globe sont

*Avicennia officinalis*, *A. germinans* et *A. marina* (Spalding *et al.*, 2010). Ces palétuviers sont en moyenne légèrement plus petits en hauteur que les palétuviers du genre *Rhizophora* mais ils peuvent atteindre cependant des hauteurs entre 16 et 22 m dans des mangroves australiennes, mexicaines et guyanaises (Komiya *et al.*, 2008). Ces arbres sont présents à la fois dans la zone de mangrove la plus proche des terres et dans la zone du front de mer. Lorsque les conditions environnementales deviennent extrêmement arides comme sur les côtes de la Mer Rouge ou du Golfe Persique, seulement quelques espèces telles que *A. marina* survivent sous des formes buissonnantes.

Enfin les genres *Bruguiera* (dont l'espèce *Bruguiera gymnorhiza* est la plus répandue) et *Sonneratia* (dont les espèces *Sonneratia alba* et *S. apetala* sont les plus répandues) rassemblent les autres genres majoritaires dans le monde. Ils ne sont présents que dans l'aire Indo-Pacifique-Ouest. Les *Bruguiera* peuvent atteindre une vingtaine de mètres dans les mangroves d'Indonésie et sont caractérisés par des racines « genouillées » (**Figure 9**). Quant aux *Sonneratia*, comme les *Avicennia*, ils développent des pneumatophores mais à la différence avec les *Avicennia*, ils ne sont pas présents en arrière mangrove mais uniquement en bordure de mangrove du côté du front de mer (Spalding *et al.*, 2010).

La dispersion des espèces végétales entre les différentes mangroves est possible grâce à la capacité de viviparité de certains palétuviers (*Rhizophora*, *Bruguiera*, *Ceriops*). Lors de la germination, le futur embryon est formé dans la graine pendant que le fruit est encore sur l'arbre. La graine, appelée propagule est une structure semi-autonome capable de photosynthèse qui se détache de la plante une fois fonctionnelle et formera une régénération puis un nouvel arbre (Rabinowitz, 1978). La dispersion des espèces de palétuviers dépend alors du type de propagules (graines, gousses, hypocotyles), de leur durée de survie dans la mer, de leur potentiel de flottabilité et de leur résistance à la dessiccation. Elles sont transportées par les courants marins et océaniques, parfois sur de longues distances (Nettel et Dodd, 2007). Les genres *Avicennia* et *Rhizophora* doivent leur large dispersion dans le monde en raison d'une longévité élevée de leurs propagules dans la mer. En effet, la durée de survie est de 3-4 mois pour les *Rhizophora* et de 3-4 semaines pour les *Avicennia* (Rabinowitz, 1978). La viabilité des propagules peut être altérée par les courants à la surface de l'eau, les températures froides et la disponibilité des habitats adaptés à leur implantation et leur germination (Duke, 2006).

### 2.2.1.2. Adaptations des palétuviers aux conditions environnementales

Les écosystèmes de mangrove sont soumis à des contraintes environnementales variables telles que l'instabilité et l'hydromorphie du substrat, le cycle des marées, la salinité, la luminosité, la température, le déficit des sédiments en oxygène lié à l'inondation du substrat et l'alternance des saisons sèches et humides. Les palétuviers ont développé des adaptations physiologiques telles que des systèmes racinaires particuliers ou des systèmes facilitant la respiration (Feller *et al.*, 2010).

L'un des facteurs environnementaux le plus contraignant dans une mangrove est la salinité du sol. Elle est dépendante de la mangrove considérée, les concentrations en chlorure de sodium allant de 33 g.L<sup>-1</sup> dans l'eau de mer jusqu'à 110 g.L<sup>-1</sup> dans les zones moins soumises aux marées comme au niveau du tanne (*i.e.* marais salants formés à l'arrière des mangroves par l'évaporation à marée basse). De plus, la salinité varie en fonction de la quantité d'eau douce présente à la surface du substrat, qui dilue le sel, et du phénomène d'évaporation qui concentre les ions et augmente la salinité (M. C. Ball, 2002). Les plantes vivant dans les mangroves sont des halophytes non obligatoires donc elles ont une tolérance au sel mais n'ont pas de besoin spécifique en sel pour leur développement. Cependant des concentrations en sel trop élevées peuvent avoir un impact négatif sur le taux de croissance et le métabolisme des palétuviers (Feller *et al.*, 2010) car elles entraînent une pression osmotique élevée au niveau des racines. Afin de maintenir le métabolisme cellulaire et une activité photosynthétique optimale, les palétuviers doivent maintenir une quantité d'eau douce suffisante dans leurs cellules, ainsi que l'équilibre osmotique (Munns et Tester, 2008). Ils mettent alors en place plusieurs mécanismes comme la modification de l'anatomie des stomates pour éviter la perte d'eau (Tomlinson, 2016) ou la formation de feuilles plus petites, plus épaisses et orientées verticalement pour réduire les expositions directes au soleil et limiter l'évapotranspiration (Lovelock et Ball, 2002). Au niveau physiologique, les espèces halophiles de mangrove peuvent (i) contrôler l'assimilation des ions sodium et chlorure dans leur cellules, (ii) les isoler des organites sensibles à l'excès de sel, les stocker puis les excréter par des glandes spécialisées et (iii) produire des solutés compatibles pour maintenir l'équilibre osmotique (Lovelock et Ball, 2002; Flowers et Colmer, 2008). Les palétuviers des genres *Avicennia*, *Acanthus*, *Aegialitis* et *Aegiceras* sont qualifiés de « sécréteurs » car ils ont la faculté d'excréter le sel absorbé par des glandes sur la face inférieure des feuilles. Ce mécanisme conduit à l'apparition de larges cristaux de sel sous la feuille, responsable de leur nom de « palétuviers blancs » ou « palétuviers gris ». A l'inverse les

palétuviers des genres *Rhizophora*, *Sonneratia* et *Bruguiera* empêchent l'entrée de sel dans leurs cellules par un système d'ultrafiltration très actif au niveau de l'endoderme racinaire. Ce mécanisme exclue les sels dissous de l'eau absorbée grâce à une filtration membranaire. Ce processus n'est cependant pas efficace contre les embruns, certains palétuviers tels que les *Xylocarpus* et *Exoecaria agallocha* stockent le sel dans leurs feuilles et l'évacuent dans les feuilles sénescents (Spalding *et al.*, 2010).

Le second facteur environnemental qui influence la croissance des mangroves et leur zonation est la tolérance à la submersion à chaque marée (Robertson *et al.*, 1992). Afin de lutter contre la faible teneur en oxygène ou l'anoxie des sédiments consécutive à la saturation du sol par l'eau de mer (Gibbs et Greenway, 2003) au-delà de 40 à 50 cm de profondeur (Marchand *et al.*, 2004), certains genres de palétuviers se sont adaptés morphologiquement par la formation de structures racinaires particulières qui permettent de maintenir l'approvisionnement constant en oxygène. Pour cela ils ont développé des racines aériennes dont deux types ont été recensés dans les mangroves : les racines échasses des palétuviers du genre *Rhizophora*, parfois des genres *Bruguiera* et *Ceriops*, et les pneumatophores des palétuviers des genres *Avicennia*, *Laguncularia* et *Sonneratia* (se référer à la **Figure 9** précédente). Les racines échasses des *Rhizophora* sont des racines aériennes partant du tronc ou des branches les plus basses. Elles sont caractérisées par la présence de cellules spécialisées appelées lenticelles facilitant la respiration des arbres, continuellement soumis aux submersions par les marées. A chaque exondation des racines, les lenticelles permettent le stockage de molécules d'oxygène qui seront ensuite absorbées par le palétuvier lors de sa submersion. Ce phénomène crée une dépression qui favorisera l'absorption de nouvelles molécules d'oxygène à la prochaine période d'exondation des racines. Les pneumatophores des *Avicennia*, *Laguncularia* et *Sonneratia* émergent des sédiments à partir des racines souterraines, ils accumulent l'air à marée basse et le redistribuent dans l'arbre à marée haute (Spalding *et al.*, 2010). Les pneumatophores peuvent s'étendre à de longues distances de l'arbre concerné. La tolérance à l'inondation est différente suivant les espèces. Une étude en Chine a montré que les *Avicennia* étaient plus sensibles à l'inondation fréquente que les *Rhizophora* et les *Bruguiera*, ils vont privilégier une répartition en arrière mangrove, moins exposés aux marées (He *et al.*, 2007) bien qu'ils peuvent être trouvés en front de mer.

Les systèmes racinaires particuliers des palétuviers tels que les racines échasses leur permettent aussi de lutter contre l'instabilité sédimentaire, en favorisant leur ancrage dans le substrat et ainsi leur résistance aux effets mécaniques des marées et des vagues. Dans le même objectif,



les genres *Bruguiera*, *Xylocarpus* et *Ceriops* ont développé des racines genouillées (**Figure 9**). Ce sont des racines souterraines peu profondes formant des arcs en forme de genoux à la surface du sol (Tomlinson, 2016). De plus, les adaptations racinaires accroissent la rétention des sédiments dans les mangroves (Feller *et al.*, 2010). La sédimentation est un processus extrêmement important dans les mangroves et a une influence sur les interactions entre les mangroves et les habitats côtiers, ainsi que sur les réponses des mangroves aux hausses du niveau des mers et aux orages intenses (Krauss *et al.*, 2003; Day *et al.*, 2008).

Beaucoup de familles de palétuviers tolérantes à la salinité et à l'inondation par les marées ont évolué vers des stratégies de reproduction spécialisées en adoptant la viviparité comme mode de reproduction sexuée (Rhizophoraceae, Avicenniaceae, Myrsinaceae, Pelliceriaceae) (Feller *et al.*, 2010). Une fois la propagule formée, si les conditions sont favorables et le terrain est propice à l'ancrage, les propagules vont développer un système racinaire et donneront de nouveaux arbres (Spalding *et al.*, 2010).

La résistance des espèces végétales de mangrove à l'ensemble des contraintes environnementales fluctuantes dans ces écosystèmes suggère que ces espèces ont une haute capacité de plasticité en comparaison avec la plupart des espèces terrestres. L'adaptation des palétuviers en réponse à la salinité, la disponibilité en nutriment, l'inondation par les marées, l'instabilité sédimentaire et le climat, influencent la composition des mangroves et à terme leur rôle dans le cycle des nutriments et du carbone (Feller *et al.*, 2010).

## 2.2.2. Compartiment faune

### 2.2.2.1. Diversité de la faune des mangroves

L'écosystème mangrove est généralement défini comme une forêt de palétuviers qui composent sa structure globale, mais il existe des milliers d'espèces d'animaux et de micro-organismes qui participent ensemble au fonctionnement de cet écosystème complexe.

Les mangroves abritent en effet, sous la canopée, une large diversité d'animaux dont certains sont présents avec des densités élevées. Cependant, cette diversité tend à diminuer par la menace anthropique liée aux activités humaines le long des côtes. A ce jour, il n'existe pas d'inventaire complet des organismes vivant en mangrove mais l'étude de Nagelkerken *et al.* (2008) a recensé un nombre important d'espèces appartenant aux groupes principaux de la faune des mangroves de plusieurs régions du monde. Les mangroves sont des habitats

favorables pour une large variété d'espèces tout au long de leur vie ou pendant une partie de leur vie en raison de leur richesse en abris et en sources de nourriture (feuilles, fruits, fleurs, plancton, algues épiphytes et micro-phyto-benthos) qui alimentent les réseaux trophiques. De plus, les ressources sont abondantes et la prédation y est faible. Les animaux se répartissent différemment sous la canopée, certains vont privilégier la surface ou l'intérieur des sédiments, d'autres vivent dans l'eau ou sur les supports immergés et certains préfèrent les zones non immergées par la marée (Nagelkerken *et al.*, 2008).

La zone délimitée entre la canopée et la surface du sédiment est caractérisée par la présence de racines aériennes offrant un substrat stable et potentiellement immergé à marée haute pour l'installation de diverses espèces de vertébrés vivant de façon permanente ou temporaire dans les mangroves. Elle est marquée aussi par la présence permanente d'une large diversité d'invertébrés appartenant au groupe des insectes (fourmis, abeilles, chenilles, papillons, termites) dont les insectes piqueurs sont les plus notoires de ces milieux (mouches, moustiques). Parmi les vertébrés, les oiseaux, les reptiles et les mammifères sont nombreux dans les forêts de mangrove. La diversité des oiseaux y est très forte et dépend de leur localisation, ils y nichent ou s'y installent en quête de nourriture ou de repos nocturne (Spalding *et al.*, 2010). Les échassiers par exemple fouillent les bancs de vase à marée basse à la recherche d'invertébrés pendant que les hérons, les aigrettes et les martins pêcheurs se nourrissent de poissons et de crustacés dans les zones d'eaux peu profondes. Les mangroves abritent aussi des cormorans, des marabouts, des aigles marins, des faucons, des bulbuls à ventre jaune, des gobe-mouches bleu, des passereaux et des colibris (Nagelkerken *et al.*, 2008).

En ce qui concerne les reptiles, le plus répandu en mangrove est le crocodile marin, il occupe les mangroves du Sri Lanka à l'Australie. C'est un animal menacé de disparition, donc des mesures de conservation ont été mises en place dans plusieurs pays pour le protéger (Nagelkerken *et al.*, 2008). Les reptiles sont aussi représentés par d'autres espèces de crocodiles pouvant atteindre 7 à 8 m de long, mais aussi des caïmans et des lézards comme le varan des mangroves qui peut mesurer jusqu'à 1 m de long. Des tortues d'eaux douces et marines (l'émyde peinte de Bornéo, la tortue à dos plat et la tortue fluviale de l'Inde), quelques espèces de grenouilles pouvant résister à des salinités élevées (la grenouille mangeuse de crabes) et des espèces de serpents aquatiques et terrestres (pythons, cobras) occupent certaines mangroves (Spalding *et al.*, 2010).

Quant aux mammifères, ce ne sont pas les plus abondants en termes de densité mais leur richesse spécifique est élevée. Parmi les mammifères des mangroves, des chauves-souris

(Bordignon, 2006), des roussettes et des primates (nasique, langur, macaque) (Moore, 2002) ont été recensés dans ces écosystèmes. Seul le nasique de Bornéo vit exclusivement dans les mangroves et se nourrit de feuilles de *Sonneratia* et de *Nipa*. Ses habitats font l'objet de mesures de conservation pour maintenir cette espèce. Tout comme le nasique, le tigre royal du Bengale (Gopal et Chauhan, 2006) est une espèce menacée par la déforestation. Il chasse les daims tachetés des mangroves (Barrett et Stiling, 2006) qui se nourrissent de feuilles de *Sonneratia*. De plus, les mangroves sont riches de petits mammifères comme des marsupiaux (le cuscous tacheté de Papouasie Nouvelle-Guinée) (Fernandes *et al.*, 2006), des lapins, des rats-laveurs, des mangoustes, le chevrotain, le renard gris (Cuarón *et al.*, 2004) et des loutres communes (Angelici *et al.*, 2005). Enfin des espèces de buffles (Dahdouh-Guebas *et al.*, 2006) et des mammifères aquatiques : dauphins (Smith *et al.*, 2006), dugongs, l'hippopotame d'Afrique de l'Ouest et lamantins (Spiegelberger et Ganslosser, 2005) choisissent les mangroves pendant une partie de leur vie.

Au niveau des sédiments, les mangroves sont riches en invertébrés benthiques colonisant une large gamme de microenvironnements. Quelques espèces demeurent à la surface des sédiments pendant que d'autres vivent dans des terriers, à la surface des pneumatophores, des troncs, des racines ou dans des galeries creusées dans le bois en décomposition (Ashton, 1999). Les racines aériennes régulièrement immergées peuvent être colonisées par des animaux épiphytes tels que des éponges, des tuniciers et des cirripèdes appartenant aux crustacés (Nagelkerken *et al.*, 2008). Elles sont aussi colonisées par un grand nombre d'espèces appartenant aux mollusques comme des bivalves filtreurs (huîtres et moules) largement commercialisés, des bernacles filtreurs et des tarets, un bivalve se nourrissant de bois en décomposition et possédant des bactéries fixatrices d'azote dans son intestin. L'escargot du genre *Terrebralia* se nourrit de feuilles mortes et les gastéropodes marins du genre *Littoraria* consomment des champignons et des végétaux (Spalding *et al.*, 2010).

De plus, les racines fournissent un refuge pour une faune mobile composée de vertébrés et d'invertébrés : des poissons uniquement à marée haute et des crustacés tels que des crabes (développé plus loin) et des crevettes pénéides. Les crustacés constituent les animaux les plus nombreux dans les mangroves. Souvent les crustacés et les poissons privilégient les abris fournis par les racines de mangroves au moment de leur reproduction et pendant le développement des stades larvaires et juvéniles. Six cent espèces de poissons ont été répertoriées dans les mangroves de l'Indo-Pacifique : le pagre berda, l'ambache du large, le carangue à gros yeux, le tarpon ou le sapsap commun par exemple (Nagelkerken *et al.*, 2008).



Les poissons des mangroves sont détritivores ou se nourrissent de zooplancton, de crustacés et de petits poissons. Parmi ces espèces, les périophtalmes, espèce étonnante de poissons amphibies, sont caractéristiques des mangroves. Les poissons trouvent refuge dans les mangroves au stade juvénile et reviennent plus tard en quête de nourriture (Spalding *et al.*, 2010) ou d'abris contre les plus grands prédateurs. Certains élasmobranches tels que le requin-citron ou la raie géante *Glaucostegus typus* (White et Potter, 2004) apprécient les températures régnant dans les eaux des mangroves au stade juvénile mais aussi plus tard pour la grande diversité en proies (Simpfendorfer et Milward, 1993).

Dans les sédiments, la méiofaune, constituée d'organismes benthiques fouisseurs tels que les petits polychètes, les copépodes et les nématodes, vit dans des terriers et réalise la bioturbation. Cette activité, aussi réalisée par les crabes bioturbateurs, permet d'améliorer les propriétés physiques des sédiments, l'oxygénation du sol, ainsi que les processus biogéochimiques (Nagelkerken *et al.*, 2008).

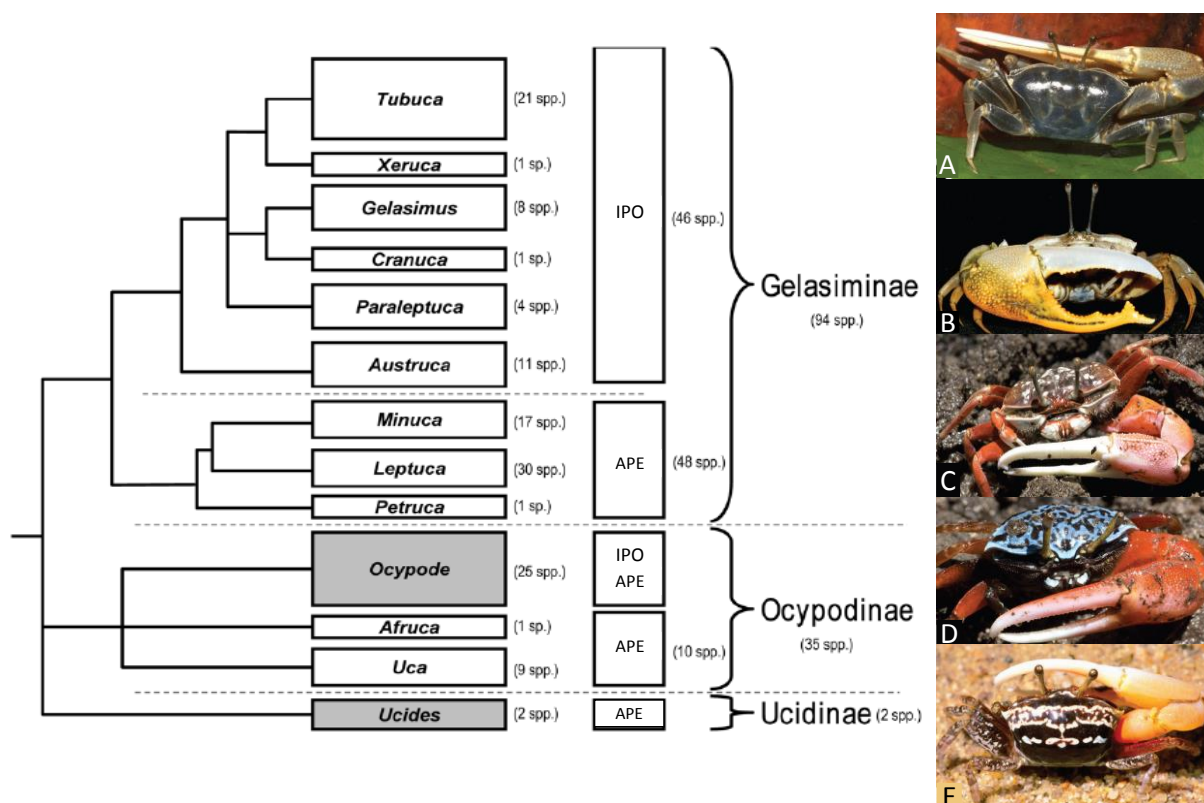
#### 2.2.2.2. Cas particulier des crabes

##### 2.2.2.2.1. Diversité des crabes de mangrove

La faune benthique des mangroves est dominée par des décapodes fouisseurs herbivores tels que les crabes violonistes (famille des Ocypodidae) et les crabes sesarmides et grapsides (famille des Sesarmidae et des Grapsidae, respectivement) (Kristensen, 2008).

Les crabes violonistes sont caractérisés par la présence chez les mâles d'une pince beaucoup plus grande que l'autre. Elle leur permet d'adresser des signaux aux femelles et aux mâles rivaux et parfois de se battre contre ces derniers. Ces crabes sont très actifs à marée basse et peuvent atteindre des densités de 70 individus par mètre carré dans de nombreuses mangroves d'Asie du Sud-Est. A de telles densités, ils brassent entre 120 et 160 cm<sup>3</sup> de sol par jour et par mètre carré (Kristensen, 2008), ce qui influence fortement le contenu et la structure du sol (Spalding *et al.*, 2010). Ils privilégient les zones ouvertes d'arrière mangrove sous les *Avicennia* et les *Heritiera* et les zones de tannes (Bouchard *et al.*, 2013) où l'intensité lumineuse est forte et stimule la croissance du micro-phyto-benthos. Ils sont aussi à l'abri du harcèlement et de la prédation des crabes Sesarmidae dans ces aires (Kristensen, 2008). Les Ocypodidae sont des détritivores, ils se nourrissent d'un mélange de micro-algues benthiques, de bactéries, de débris de feuille et de détritus en grattant la surface des sédiments (Cannicci *et al.*, 2008).

D'un point de vue taxonomique, les crabes violonistes ont longtemps été considérés comme appartenant à un genre unique, le genre *Uca*. Tout comme les crabes fantômes (Sakai et Türkay, 2013), ils appartiennent à la famille des Ocypodidae. La classification de cette famille a récemment été réévaluée grâce aux analyses moléculaires basées sur le gène nucléaire 28S rDNA, le gène mitochondrial 16S rDNA et sur la sous-unité I du cytochrome oxydase (Shih *et al.*, 2016). Désormais les Ocypodidae sont séparés en 3 sous-familles : les Ocypodinae, les Gelasiminae et les Ucidinae (**Figure 10**).



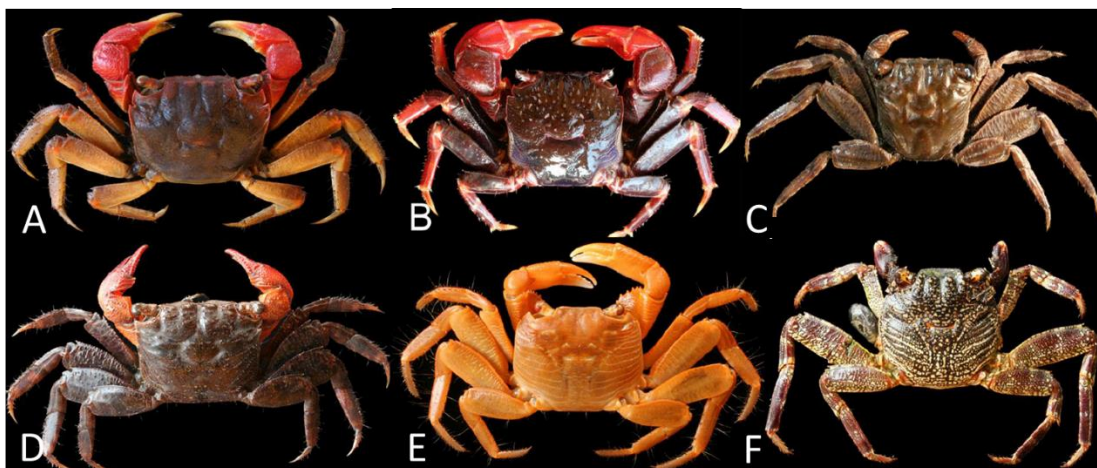
**Figure 10.** Arbre phylogénétique simplifié d'après Shih *et al.* (2016) rassemblant les genres de la famille des Ocypodidae répartis dans la zone Indo-Pacifique Ouest (IPO) et dans la zone Atlantique-Pacifique Est (APE). Le nombre d'espèces pour chaque genre est indiqué à côté du genre concerné. Les genres grisés ne contiennent pas de crabe violoniste. Les photos représentent des exemples de crabes violonistes : (A) *Tubuca urvillei*, (B) *Gelasimus vocans*, (C) *Cranuca inversa*, (D) *Paraleptuca chlorophthalmus* et (E) *Austruca annulipes*.

Seuls les Ucidinae ne contiennent pas de crabe violoniste. Les Gelasiminae rassemblent 9 genres de crabes violonistes différents dont 6 dans la zone Indo-Pacifique Ouest (*Tubuca*, *Cranuca*, *Austruca*, *Xeruca*, *Gelasimus* et *Paraleptuca*) et 3 dans la zone Atlantique-Pacifique Ouest (*Minuca*, *Leptuca* et *Petruca*), alors que les Ocypodinae rassemblent 2 genres de crabes

violonistes uniquement en Atlantique-Pacifique Ouest. Au total 104 espèces de crabes violonistes ont été recensées dans le monde (Shih *et al.*, 2016).

Les Sesarmidae et les Grapsidae sont des consommateurs de litière de feuilles qu'ils transportent et stockent dans leur terrier (Lee, 1998; Cannicci *et al.*, 2008). *Neosarmatium smithii* par exemple, le crabe dominant de certaines mangroves australiennes à *Ceriops tagal*, sort de son terrier la nuit pour récolter les feuilles au sol (Bouchard *et al.*, 2013). Les Sesarmidae privilégient les zones de mangrove fermée, où la source de nourriture est abondante sous la canopée et dans lesquelles le réseau de pneumatophores et de racines offre une protection contre les prédateurs et les fortes températures (Kristensen, 2008). Ils creusent des terriers dans les racines de *Rhizophora* et de *Ceriops* (Gillikin et Schubart, 2004; Bouchard *et al.*, 2013) mais *Neosesarmatium meinerti* peut aussi être trouvé en arrière mangrove au niveau des *Avicennia* et des *Heritiera*. Tout comme *Parasesarma leptosoma*, il grimpe dans les palétuviers à marée haute (Bouchard *et al.*, 2013). La densité des Sesarmidae (1-5 ind.m<sup>-2</sup>) est plus faible que celle des crabes violonistes, mais ils sont plus gros donc la quantité de sédiments bioturbés est similaire (80-210 cm<sup>3</sup>.m<sup>-2</sup>.j<sup>-1</sup>) (Kristensen, 2008).

La classification des crabes appartenant aux familles de Sesarmidae et Grapsidae, basée sur des comparaisons morphologiques, a été confirmée par des outils moléculaires. Ces familles font partie de la super-famille des Grapsoidea rassemblant 8 familles. Les Sesarmidae comptent 32 genres et 285 espèces dont les genres *Neosarmatium*, *Parasesarma*, *Metasesarma* et *Perisesarma* (**Figure 11**). Quant aux Grapsidae (**Figure 11**), ils sont moins nombreux avec 8 genres différents dont *Geograpsus*, *Grapsus*, *Metopograpsus* et *Pachygrapsus* et 44 espèces (Davie *et al.*, 2015). Ces deux familles sont présentes dans les deux aires de répartition mondiale des mangroves. Leur établissement dans une zone de mangrove peut ou non dépendre de l'espèce de palétuvier dominante sur cette zone. Ce sont des espèces ubiquistes qui, pour certaines, peuvent être confondues avec des espèces marines (Nagelkerken *et al.*, 2008).



**Figure 11.** Les photos de (A) à (D) sont des exemples de crabes appartenant à la famille des Sesarmidae : (A) *Neosarmatium meinerti*, (B) *Neosarmatium smithii*, (C) *Parasesarma leptosoma*, (D) *Perisesarma guttatum*. Les photos (E) et (F) sont des exemples de crabes de la famille des Grapsidea : (E) *Geograpsus crinipes*, (F) *Grapsus tenuicrustatus* d'après (Bouchard *et al.*, 2013).

#### 2.2.2.2.2. Les espèces ingénieurs

Parmi l'ensemble de la faune des mangroves, les crabes sont particulièrement importants en raison de leur statut d'espèces ingénieurs. Le concept d'organismes ingénieurs a été introduit il y a une vingtaine d'années par Jones *et al.* (1994, 1997). Les espèces ingénieurs sont des organismes qui modulent directement ou indirectement la disponibilité des ressources pour les autres espèces en modifiant physiquement le matériel biotique ou abiotique (Jones *et al.*, 1994). Le transfert de ressource directement d'un organisme à un autre sans transformation de la ressource n'est pas considéré comme de l'ingénierie mais comme de l'interaction trophique (Kristensen, 2008). Deux types d'organismes ingénieurs peuvent être définis en fonction des mécanismes utilisés pour changer l'environnement. Les ingénieurs autogènes utilisent leur propre structure physique pour changer l'environnement (tissus vivants ou morts des arbres et coraux) alors que les espèces ingénieurs allogènes changent l'environnement en transformant la matière vivante ou morte d'un état à un autre par des moyens mécaniques (Jones *et al.*, 1994). Il est important de différencier les espèces ingénieurs des espèces dites « clés » dans l'écosystème. Les espèces « clés » interviennent dans les chaînes trophiques, leur disparition entraînerait des changements massifs dans la composition des espèces et le fonctionnement de l'écosystème (Kristensen, 2008). Les espèces ingénieurs peuvent avoir des effets négatifs ou positifs sur la richesse et l'abondance des autres espèces à petite échelle mais l'effet net à grande

échelle serait positif car dans la plupart des cas, un environnement contenant des espèces ingénieurs serait stable à long terme (Jones *et al.*, 1997).

Les crabes sont des espèces ingénieurs allogènes, ils prennent le matériel dans l'environnement (feuilles, sédiments) et le transforment d'un état physique 1 à un état physique 2. Ils créent un lien agissant sur les flux de ressources disponibles pour les autres organismes (Jones *et al.*, 1994). Les palétuviers sont des ingénieurs importants qui forment l'environnement unique des mangroves mais les crabes sont des ingénieurs indispensables dans le transfert efficace des éléments en maintenant une diversité fonctionnelle élevée et l'hétérogénéité des sédiments (Kristensen, 2008).

#### 2.2.2.2.3. Rôles fonctionnels des crabes dans les mangroves

Les crabes de mangrove jouent un rôle écologique déterminant dans le maintien structural et fonctionnel des écosystèmes mangroves (Cannicci *et al.*, 2008). Ces organismes bioturbateurs creusent et maintiennent des terriers plus ou moins profonds pour leur habitat, le stockage de nourriture, ou pour créer un refuge contre les prédateurs ou les conditions environnementales extrêmes (*e.g.* marée haute, fortes températures, sécheresse). Les Ocypodidae creusent généralement des terriers en forme de « J » ou de « L » de 10 à 40 cm de profondeur terminés par une chambre, alors que les terriers des Sesamididae sont des galeries verticales plus ou moins ramifiées formant un labyrinthe variant de 55 à 110 cm de profondeur. Par conséquent, l'ensemble des crabes de mangrove affectent la topographie de leur environnement en mixant les sédiments, en drainant et en modifiant la granulométrie des sédiments (Kristensen, 2008). Les crabes de la famille des Sesamididae furent les premiers membres de la macrofaune considérés comme des acteurs principaux dans les processus de structuration de la mangrove (Cannicci *et al.*, 2008).

Smith *et al.* (1991) ont été les premiers à réaliser des expérimentations sur les crabes pour démontrer leur rôle crucial d'ingénieur dans l'écosystème mangrove. Leur activité de bioturbation favorise l'oxygénation des sédiments (Smith *et al.*, 1991) ainsi que la circulation de l'eau et de la matière organique (Botto *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2006). Les crabes permettent des échanges d'eau efficaces entre l'eau de mer à la surface et l'eau des nappes souterraines grâce au réseau interconnecté de galeries (Botto *et al.*, 2006) et permettent l'évacuation du sel stocké autour des racines de palétuviers (Cannicci *et al.*, 2008). Ils modifient considérablement la physico-chimie des sédiments (Kristensen, 2008) et favorisent la rétention

du carbone organique en profondeur (Andreetta *et al.*, 2014). En accroissant l'aération des sédiments, les crabes influencent le développement, la productivité et la reproductivité des palétuviers (Smith *et al.*, 1991). Les palétuviers forment plus de feuilles et de pneumatophores en présence des crabes (Kristensen et Alongi, 2006; Kristensen, 2008). De plus, les crabes diminuent significativement les concentrations en ammonium et en sulfure dans les sédiments (Cannicci *et al.*, 2008) et modifient les conditions redox du sol en favorisent la formation de formes oxydées d'éléments chimiques (Fe et S) (Kristensen et Alongi, 2006).

Les crabes sont des consommateurs de litière déposée au sol, principalement composée de feuilles mais aussi de propagules. Certains Sesamidae peuvent monter dans les palétuviers pour cueillir directement des feuilles fraîches (Dahdouh-Guebas *et al.*, 1999). Leurs habitudes alimentaires d'enfouissement de la litière dans leur terrier leur permettent de faciliter la dégradation de la matière organique et donc de participer à l'enrichissement des sédiments en matière organique (Camilleri, 1992; Botto *et al.*, 2006). Ils facilitent la minéralisation et le recyclage des nutriments, réduisant ainsi l'exportation de la matière organique par les marées (Kristensen, 2008). Moins de 50 % de la litière consommée est assimilée par les crabes, donc près de la moitié du matériel consommé est évacué par les matières fécales permettant à nouveau l'enrichissement du sédiment en matière organique. De plus, il a été montré que le passage de la litière par le système digestif des crabes enrichissait la qualité nutritionnelle de la matière organique rejetée. Ceci se traduit par exemple par une augmentation du contenu en azote avant le rejet dans l'environnement, ce qui augmenterait la source de nourriture pour les invertébrés benthiques et les bactéries du sédiment (Cannicci *et al.*, 2008). Par le transport et le broyage d'une large quantité de litière de feuilles, les crabes augmentent rapidement la production primaire des mangroves (Lee, 1997). Ils transforment alors la litière en matériels détritiques, base des réseaux trophiques de la mangrove, rendant les nutriments disponibles pour les niveaux trophiques inférieurs (Lee, 1998; Kristensen, 2008). Les crabes forment aussi un important lien entre la base des réseaux trophiques et les consommateurs des niveaux trophiques supérieurs (Sousa et Dangremond, 2011). Ils sont par exemple chassés par certains prédateurs tels que les reptiles et les oiseaux, ainsi que par les poissons lors de la marée haute (Nagelkerken *et al.*, 2008).

De plus, ils participent à la régulation des palétuviers en limitant l'implantation de chaque propagule dans les sédiments, donc ils influencent la structuration végétale des mangroves (Cannicci *et al.*, 2008). Par exemple, en consommant les propagules de *Rhizophora*, *Neosarmatium meinerti* empêche la germination de la propagule dans le sol et le

développement d'une régénération d'un nouveau *Rhizophora* (Dahdouh-Guebas *et al.*, 1997). Le même phénomène a été observé pour des *Avicennia* (McKee, 1995) et des *Ceriops* (McGuinness, 1997). Mais les propagules déplacés ne sont pas toujours consommés, ils peuvent être entraînés par les marées loin de l'arbre d'origine et germer si les conditions sont favorables. Ceci à grande échelle influence la distribution des palétuviers dans la mangrove (Cannicci *et al.*, 2008).

Les crabes fournissent donc un nombre important de services écosystémiques permettant le bon fonctionnement de la mangrove, leur absence pourrait influencer négativement l'écosystème mangrove. Une expérience de suppression des crabes en mangrove australienne a montré une augmentation significative des taux de sulfure et d'ammonium dans le sol et une diminution de la croissance des palétuviers (Hogarth, 2015). De plus, les mangroves sont continuellement soumises à des contaminants anthropiques affectant fortement la diversité et le fonctionnement du macro-benthos (Cannicci *et al.*, 2009; Bartolini *et al.*, 2011; Fusi *et al.*, 2016; Banci *et al.*, 2017), entraînant de possibles implications sur la vulnérabilité des mangroves au changement climatique et sur la fourniture des services écosystémiques rendus par la mangrove (Fusi *et al.*, 2016).

#### 2.2.2.3. Cas particulier de la méiofaune

Les premiers millimètres des sédiments de mangrove ou les feuilles en décomposition à la surface sont le siège d'organismes benthiques microvores, dépositivores ou carnivores formant la méiofaune. Ce sont des organismes compris entre 30 et 1000  $\mu\text{m}$  très diversifiés (Giere, 2009). Dans les mangroves, la méiofaune est dominée en terme d'abondance et de biomasse par les nématodes et les copépodes harpacticoïdes mais elle comprend aussi des organismes rares tels que les oligochètes, les kinorhynches, les foraminifères et les rotifères (Netto et Gallucci, 2003). Leur organisation spatiale est associée à celle du microphytobenthos des sédiments composés d'agrégats microbiens phototrophes qui fournissent de la nourriture et un refuge à la méiofaune (Bertrand *et al.*, 2011). Ces organismes se nourrissent de phytodétritus, de matériel en décomposition, de bactéries, de ciliées, de cyanobactéries, d'algues vertes, de diatomées, ou d'autres nématodes (Nagelkerken *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2014). Leur temps de génération court leur permet de réagir rapidement aux changements environnementaux (salinité, marée haute, concentration en oxygène, contenu organique et granulométrie des sédiments). Ces variations conduisent à des modifications d'abondance, de distribution spatiale



et de composition de ces communautés. La méiofaune est donc privilégiée comme bio-indicateur dans le suivi des environnements marins (Moreno *et al.*, 2011).

Ils ont un rôle fonctionnel important dans le réseau trophique de par leur position intermédiaire entre les microorganismes et les organismes des niveaux trophiques supérieurs (Netto et Gallucci, 2003; Della Patrona *et al.*, 2016). Ils sont aussi une ressource pour un large nombre de macroorganismes comme les crustacés et les poissons. Tout comme les crabes, la méiofaune comprend des organismes dits « ingénieurs ». Ces invertébrés participent à la structuration des sédiments par la bioturbation et à leur irrigation par circulation d'un courant d'eau. Ils améliorent ainsi les propriétés physicochimiques des sédiments et favorisent l'activité microbienne par oxygénation des couches supérieures des sédiments (Nagelkerken *et al.*, 2008). Ces communautés assurent la biominéralisation de la matière organique notamment par la dégradation de la litière, ainsi que le recyclage des nutriments et du carbone organique. Elles favorisent l'enrichissement des eaux côtières et la disponibilité des nutriments pour les communautés benthiques marines (Chinnadurai et Fernando, 2007).

### 2.2.3. Les communautés microbiennes des sédiments

En comparaison avec d'autres écosystèmes tropicaux, les mangroves sont caractérisées par une faible diversité de palétuviers, cependant elles contiennent des communautés microbiennes très diversifiées (Alongi, 2009b). Le compartiment microbien des mangroves se compose à 91 % de champignons, de bactéries et d'archées, de 7 % de protozoaires tels que des ciliés unicellulaires, et de 2 % de micro-algues (Holguin *et al.*, 2001). Les microorganismes présents dans les sédiments, l'eau ou à la surface de la végétation, ont une grande importance dans les cycles biogéochimiques des nutriments, en particulier dans le cycle de l'azote et du phosphore (Alvarenga *et al.*, 2015). De plus il a été démontré que les microorganismes sont essentiels pour la génération et la décomposition organique du sol et qu'ils sont des organismes clés dans la régulation de la productivité des végétaux et la dynamique de la communauté végétale (Harris, 2009). Ils contribuent également à promouvoir la croissance et la santé des palétuviers par la solubilisation des nutriments, la fixation du diazote, la production d'hormones végétales et la dégradation de composés phytotoxiques (Höflich *et al.*, 1994).



#### 2.2.3.1. Les champignons des mangroves

Parmi les eucaryotes hétérotrophes, les champignons des mangroves ont été décrits pour la première fois par Cribb et Cribb (1955). Actuellement plus de 850 espèces fongiques sont recensées (Schmit et Shearer, 2003; Shearer et Raja, 2010). Leur rôle écologique dans l'écosystème mangrove est assez mal compris à ce jour, même si en général il est similaire à celui des champignons terrestres. Il existe des ascomycètes saprophytes (le groupe taxonomique le plus répandu dans les mangroves) et des basidiomycètes dans les zones intertidales et marines de la mangrove (Arfi, 2012). Les champignons de mangroves participeraient activement aux processus de dégradation de la litière et interviendraient dans les réseaux trophiques au niveau du cycle des nutriments (Hyde et Lee, 1995). La communauté fongique de la mangrove se compose aussi de champignons phytopathogènes responsables de l'altération des feuilles et des racines des palétuviers. Par exemple, les palétuviers du genre *Rhizophora* seraient plus sensibles à ces parasites que les palétuviers du genre *Avicennia* (Gilbert *et al.*, 2002). En revanche, des communautés fongiques vivant en symbiose avec certains palétuviers amélioreraient la croissance de ces derniers en favorisant l'absorption des nutriments (Y. Wang *et al.*, 2010).

#### 2.2.3.2. Les phototrophes

A la surface des sédiments (Holguin *et al.*, 2001), des rochers, du bois en décomposition ou à la surface des racines, troncs et feuilles de palétuviers (Gomes *et al.*, 2010), certains microorganismes aérobies sont organisés en biofilm microbien, constitué principalement d'eucaryotes autotrophes, de cyanobactéries autotrophes et de bactéries hétérotrophes, l'ensemble agrégé dans une matrice organique excrétée par les microorganismes eux-mêmes sous forme d'EPS (Extracellular Polymeric Substances). Ces EPS permettent l'adhésion des cellules au substrat, leur mobilité par glissement et le stockage important de matière organique constituant une source de nourriture pour de nombreux microorganismes benthiques (Bertrand *et al.*, 2011). De plus, cette matrice extracellulaire confèrerait aux cellules microbiennes un fort potentiel de résistance pendant les périodes de stress (changement de salinité et de température, irradiation UV et dessiccation) et elle améliorerait les activités physiologiques globales des bactéries (Decho, 2000). Le biofilm microbien est constitué de microorganismes faisant partie du microphytobenthos (Decho, 2000). Il est principalement composé d'algues vertes, de diatomées, et de cyanobactéries. Ces organismes unicellulaires photosynthétiques assurent la production primaire et réalisent une photosynthèse oxygénique (Bertrand *et al.*, 2011). Les

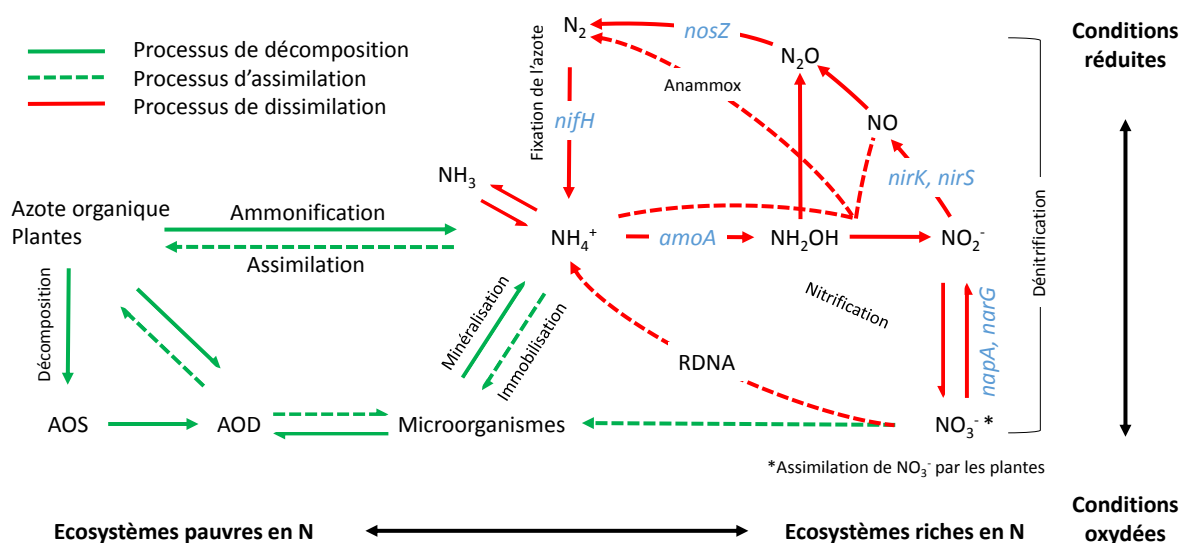
micro-algues ont des formes morphologiques très caractéristiques permettant de les étudier par observations microscopiques et marqueurs biochimiques (Bertrand *et al.*, 2011). Dans l'écosystème mangrove, les phototrophes participent à la transformation des nutriments, à la stabilisation des sédiments contre la re-suspension, à la croissance des palétuviers, à la création de niches protectrices pour les agents pathogènes (Bouchez *et al.*, 2013), et à la sorption de métaux toxiques et d'autres contaminants. Les cellules intégrées dans le biofilm microbien sont généralement plus résistantes aux antibiotiques, aux métaux toxiques et aux agents toxiques antimicrobiens (Decho, 2000). Les phototrophes sont aussi une ressource en matière organique pour les organismes supérieurs dans la chaîne trophique incluant des eucaryotes unicellulaires, les crustacés, les mollusques, les larves d'insectes, la méiofaune en particulier les nématodes et quelques espèces de poissons (Holguin *et al.*, 2001). Les cyanobactéries sont particulièrement importantes dans le fonctionnement de l'écosystème mangrove grâce à leur contribution dans la fixation de l'azote atmosphérique et du carbone. Les cyanobactéries épiphytes enrichissent le sédiment en nutriments qui seront ensuite puisés par les palétuviers de mangrove : azote et carbone fixés mais aussi des molécules stimulant leur croissance ou des molécules leur permettant de se défendre contre les herbivores (Alvarenga *et al.*, 2015). Plusieurs études se sont intéressées à la spécificité des cyanobactéries pour les arbres de mangrove, au niveau de leurs racines ou des pneumatophores, plusieurs espèces ont été retrouvées sur les troncs et racines de palétuviers du genre *Rhizophora* (Nogueira et Ferreira-Correia, 2001). En revanche certaines souches ont été montrées exclusivement présentes sur des arbres spécifiques tels que des *Avicennia marina* ou des *Ceriops tagal* dans des mangroves de l'Inde (Silambarasan *et al.*, 2012) ou du Mozambique (Siva, 1991).

#### 2.2.3.3. Les microorganismes impliqués dans le cycle de l'azote

Les microorganismes impliqués dans le cycle de l'azote (bactéries et archées) participent activement à la transformation alternative de l'azote organique à l'azote minéral à travers différents stades d'oxydation. Cet élément essentiel est alors retrouvé sous la forme d'azote organique ( $N_{org}$ ), d'ammonium ( $NH_4^+$ ), de nitrite ( $NO_2^-$ ), de nitrate ( $NO_3^-$ ), ainsi que sous des formes gazeuses telles que le diazote ou azote atmosphérique ( $N_2$ ) ou des gaz à effet de serre : monoxyde d'azote (NO) et oxyde nitreux ( $N_2O$ ). Les sources d'azote les plus abondantes pour les microorganismes sont l'ammonium, le nitrate et le diazote. La réalisation du cycle de l'azote va réguler la quantité d'azote disponible pour la chaîne trophique (Bertrand *et al.*, 2011). Les

processus métaboliques impliqués dans le cycle de l'azote présents dans les mangroves dépendent de l'activité microbienne qui elle-même est influencée par les conditions environnementales du milieu telles que la température, l'humidité, le pH (Alongi *et al.*, 1992), la salinité (Tam, 1998), le ratio carbone/azote, et la concentration en nutriments et oxygène dissous (Li et Gu, 2013). De plus la présence des racines de palétuviers, la bioturbation par les crabes et le phénomène des marées induisent des alternances de conditions oxiques et anoxiques dans les sédiments qui vont conditionner les processus métaboliques mis en jeu (Ramachandran *et al.*, 2008).

Les processus microbien observés dans les sédiments de mangrove sont la fixation d'azote, l'ammonification, la nitrification, la dénitrification, l'oxydation anaérobie de l'ammonium (anammox) et la réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (RDNA) (Alongi *et al.*, 1992; Ramachandran *et al.*, 2008) (**Figure 12**).



**Figure 12.** Cycle de l'azote dans les sédiments de mangrove. Anammox : oxydation anaérobie de l'ammonium, RDNA : réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium, AOS : azote organique du sol, AOD : azote organique dissous (modifié d'après Levy-Booth *et al.*, 2014).

La fixation de l'azote est réalisée par des microorganismes diazotrophes (cyanobactéries, bactéries et archées) libres aérobies (*e.g.* *Azotobacter*, *Trichodesmium*) ou anaérobies (*e.g.* *Clostridium*, bactéries sulfato-réductrices) ou vivant en symbiose avec des plantes (*e.g.* *Rhizobium*) (Alongi *et al.*, 1992; Bertrand *et al.*, 2011). Une forte densité de diazotrophes a été détectée dans les sédiments de mangrove (Dias *et al.*, 2012). La fixation de l'azote correspond

à la conversion du  $N_2$  en une forme de l'azote assimilable par les plantes et les animaux : le  $NH_4^+$  et sa forme libre en équilibre l'ammoniac ( $NH_3$ ). Cette réaction est catalysée par une nitrogénase contenant deux protéines : une dénitrégénase réductase fournissant des électrons nécessaires à une autre dénitrégénase pour transformer le  $N_2$  en  $NH_3$  (Bertrand *et al.*, 2011).

La décomposition de l'azote organique par voie biologique hétérotrophe est appelée l'ammonification ou minéralisation de l'azote organique. Elle permet de produire de l'ammonium et de l'ammoniac par une simple réaction de désamination ou par une succession de réactions métaboliques complexes comprenant des hydrolyses (Bertrand *et al.*, 2011) (**Figure 12**).

Le processus de nitrification a lieu en aérobie, proche de la surface des sédiments, dans la zone micro-oxique créée par les racines des palétuviers et dans les terriers de la faune des mangroves (Ramachandran *et al.*, 2008). Ce mécanisme consiste à oxyder dans un premier temps l'ammonium en hydroxylamine ( $NH_2OH$ ) par l'ammonium mono-oxygénase puis en nitrite grâce à des bactéries autotrophes aérobies oxydant l'ammonium (AOB ou bactéries nitrosantes ou nitritantes, *e.g. Nitrosomonas*) et des archées oxydant l'ammonium (AOA) grâce à une hydroxylamine oxydoréductase. Puis le  $NO_2^-$  formé est transformé en  $NO_3^-$  par des bactéries oxydant les nitrites (NOB ou bactéries nitrifiantes, *e.g. Nitrobacter*) grâce à une nitrite oxydoréductase (Bertrand *et al.*, 2011). Le nitrate est ensuite rapidement utilisé dans d'autres processus métaboliques mais aussi pour la croissance des palétuviers et des cellules bactériennes (Alongi *et al.*, 1992) (**Figure 12**).

La dénitrification est réalisée en anaérobiose par des bactéries hétérotrophes (*e.g. Pseudomonas aeruginosa* et *Paracoccus denitrificans*) et autotrophes (*e.g. Thiobacillus denitrificans*). Dans les sols anoxiques, ces bactéries utilisent le nitrate comme accepteur terminal d'électron à la place de l'oxygène (Knowles, 1996). Il s'agit d'un métabolisme respiratoire anaérobie. Le  $NO_3^-$  est d'abord réduit en  $NO_2^-$  en anaérobiose par la nitrate réductase, puis le  $NO_2^-$  en NO et en  $N_2O$  grâce à la nitrite réductase et à l'oxyde nitrique réductase, respectivement. Enfin le  $N_2O$  est réduit en  $N_2$  par l'oxyde nitreux réductase et libéré dans l'atmosphère. En présence de dioxygène, la dernière étape est inhibée et libère du  $N_2O$  au lieu du  $N_2$ . La dénitrification participe alors à la perte d'azote du sol par les émissions de NO,  $N_2O$  ou de  $N_2$  dans l'atmosphère (Bertrand *et al.*, 2011) (**Figure 12**).

L'ammonium peut être aussi formé par la réduction directe du nitrate, en plus faible quantité que *via* l'ammonification, par la réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (RDNA) en

condition anoxique. Cette réaction présente un intérêt écologique majeur pour l'écosystème car contrairement à la dénitrification qui constitue une perte nette d'azote pour les sédiments, la RDNA conduit à la formation d'un produit disponible pour la chaîne trophique (Bertrand *et al.*, 2011) (**Figure 12**).

Enfin l'anammox, ou l'oxydation anaérobie de l'ammonium, est réalisée par des bactéries anammox anaérobies appartenant au phylum des *Planctomycetes*. Elles sont caractérisées par la présence d'un organite particulier appelé l'anammoxosome contenant du ladderane permettant la réaction d'anammox (Bertrand *et al.*, 2011). Les bactéries anammox sont présentes dans des écosystèmes pauvres en oxygène tels que les sédiments de mangrove (Li et Gu, 2013). Elles produisent du diazote émis dans l'atmosphère par l'oxydation de l'ammonium et du nitrite grâce à l'hydrazine oxydase et l'hydrazine synthase. L'activité anammox a été mise en évidence dans les stations de traitement des eaux usées et peut produire jusqu'à 60 % de diazote dans certains écosystèmes (Bertrand *et al.*, 2011). La contribution de ces bactéries dans la libération du N<sub>2</sub> provenant des sédiments de mangrove est en revanche moins importante que celle des bactéries dénitrifiantes (Fernandes *et al.*, 2012). De plus l'activité anammox est optimale à 15°C mais devient nulle aux alentours de 37°C où la dénitrification devient dominante (Bertrand *et al.*, 2011) (**Figure 12**).

Bien que les mangroves soient riches en matière organique, elles sont généralement déficientes en nutriments (Boto et Wellington, 1984), en particulier en azote (Ray *et al.*, 2014) et en phosphore (Prasad, 2012). Les sédiments des mangroves sont principalement composés d'azote organique qui n'est assimilable directement que par la faune et non par les palétuviers (Bertrand *et al.*, 2011). Les concentrations en azote inorganique dissous (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), assimilable par les microorganismes et les végétaux, sont faibles en mangrove en comparaison aux autres sédiments marins. Parmi ces formes de l'azote, l'ammonium est le plus abondant (Ramachandran *et al.*, 2008). Cependant les mangroves sont très productives. Ce paradoxe est expliqué par un système de recyclage très efficace de la matière organique dans lequel les nutriments essentiels sont conservés et de nouveaux éléments nutritifs sont régénérés à partir de la décomposition et de la dégradation de la litière par les microorganismes (Holguin *et al.*, 2001). L'azote sous forme organique devient du NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, du NH<sub>3</sub>, du NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, ou du NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (NO<sub>x</sub>) donc des ressources assimilables pour les palétuviers (Ganguly *et al.*, 2009). Les microorganismes du cycle de l'azote jouent alors un rôle fonctionnel indispensable pour les communautés végétales des mangroves. De plus, il a été montré que la croissance des arbres

est grandement favorisée par la présence de bactéries fixatrices d'azote au niveau des racines de palétuviers (Alongi, 2009a).

Les sédiments contiennent 76,8 % de l'azote total présent en mangrove, seulement 23,2 % sont contenus dans les feuilles, les tiges et les racines des palétuviers (Ramachandran *et al.*, 2008). Pour les palétuviers, la plus grande proportion d'azote est contenue dans les feuilles et dans les propagules (Ramachandran *et al.*, 2008). Au moins 15 à 70 % de  $\text{NH}_4^+$  issu de la minéralisation de la matière organique pourrait être éliminé des sédiments sous forme gazeuse ( $\text{N}_2\text{O}$  et  $\text{N}_2$ ) par le couplage nitrification-dénitrification. Ces formes de l'azote peuvent également être libérées dans l'atmosphère suite à la dénitrification et à l'anammox dans les sédiments de mangrove (Bertrand *et al.*, 2011). L'activité microbienne des mangroves permet de limiter la quantité d'azote dans les sédiments en assurant un relargage massif d'azote dans l'atmosphère. Les mangroves sont alors une source importante d'azote atmosphérique (Ray *et al.*, 2014). Or le  $\text{N}_2\text{O}$  est un gaz à effet de serre qui, comme le méthane et le dioxyde de carbone, contribue à l'augmentation de la température moyenne de la surface de la terre.

Les microorganismes impliqués dans le cycle de l'azote jouent un rôle dans la bioépuration des sédiments de mangrove soumis à des rejets d'eaux usées domestiques provenant des agglomérations voisines. Ces effluents contiennent notamment de l'azote soluble sous forme d'azote organique et d'ammonium. Il a ainsi été montré que les taux de dénitrification étaient élevés dans les sédiments de mangrove soumis aux rejets d'eaux usées (Kristensen *et al.*, 1998). L'élimination de l'azote des sédiments s'effectuant en grande partie par la dénitrification, ce processus fournirait un fort potentiel aux mangroves dans l'élimination de l'excès d'azote dans les sédiments (Ramachandran *et al.*, 2008).

#### 2.2.4. Services écosystémiques

La mangrove est un écosystème à part entière, répertorié comme un des plus productifs au monde (Alongi, 2002; Mohamed *et al.*, 2016). Les forêts de mangroves sont caractérisées par une productivité primaire, une biomasse totale et une production de litière plus élevées en tonnes par hectare que celles des forêts de milieux tempérés (Mohamed *et al.*, 2016). Les valeurs de production primaire par unité de surface sont plus élevées que celles des forêts humides des tropiques (Alongi, 2009b). La biomasse totale est calculée en ajoutant les biomasses aériennes et souterraines de chaque palétuvier. Le pourcentage de biomasse aérienne est essentiellement lié à la biomasse apportée par le tronc et les branches, les racines aériennes

ne participent que très peu à la valeur finale. La biomasse souterraine apportée par les racines souterraines joue un rôle essentiel dans l'ancrage des palétuviers au sol. Elle participe à la consolidation des mangroves sur des substrats instables, soumis aux facteurs érosifs et permet ainsi la rétention des sédiments et de la matière organique (Komiyama *et al.*, 2008).

Les mangroves ont un rôle biologique indispensable car elles présentent un environnement riche en biodiversité et fournissent un nombre de services écosystémiques importants pour la société humaine et les communautés côtières et marines. Leur couvert végétal et leur localisation leur permettent de protéger les côtes et de stabiliser le sol sédimentaire par leur système racinaire complexe (Blasco, 1991). Elles forment une barrière naturelle contre l'érosion naturelle liée à la force des vagues (**Figure 13**) et elles servent de zone tampon en réduisant l'impact du vent et des catastrophes naturelles telles que les tempêtes, les tsunamis ou les ouragans (Alongi, 2008).

Les mangroves représentent une source de nourriture et de matériels pour les pêcheurs, les fermiers et le reste de la communauté locale (Aburto-Oropeza *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2014). Elles fournissent de la nourriture (fruits de *Sonneratia*, *Avicennia* et *Bruguiera*, poissons, crustacés, coquillages), du sucre, du miel, de l'alcool, des sources médicinales (feuille, écorce, fruit), du chaume issu de *Nypa fruticans* pour les toitures, et du fourrage pour l'élevage d'animaux (Spalding *et al.*, 2010). Le bois est une des ressources principales (**Figure 13**), il est nécessaire pour cuisiner des plats (bois de feu, charbon de bois), la fabrication d'ustensiles de cuisine, d'outils de pêche ou de matériaux (poteaux, planches) utiles pour les constructions de bateaux, d'habitations et de bâtiments (Giri *et al.*, 2011). Le bois dense de certains palétuviers est particulièrement recherché dans les constructions pour sa résistance. L'aquaculture est une des principales ressources financières des populations de mangrove, la faune de mangrove représente par exemple 30 % des poissons pêchés et 100 % des crevettes collectées dans les pays d'Asie. Les prélèvements de bois et les activités de pêche dans les mangroves ont débuté dès l'implantation des premières sociétés humaines vivant le long de ces dernières. Puis l'utilisation à grande échelle et industrielle des mangroves s'est fortement développée avec l'augmentation de la démographie (Spalding *et al.*, 2010).





**Figure 13.** Les services écosystémiques fournis par les mangroves : (A) érosion naturelle d'une côte qui n'est plus protégée par la mangrove, (B) et (C) utilisation de la ressource en bois pour la construction de bâtiment et la préparation de plats cuisinés.

Les forêts de mangrove sont primordiales pour la faune locale car elles servent d'habitat et de nurserie pour les espèces pélagiques telles que les poissons, les crevettes et les crabes (Aburto-Oropeza *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2014), mais aussi pour les espèces d'oiseaux (hérons, aigrettes), de reptiles (crocodiles, serpents), d'amphibiens et de mammifères (singes, tigres, dauphins) (Alongi, 2002). Les connections des mangroves avec les habitats voisins favorisent les relais trophiques et améliorent leur fonction de nurserie (Lee *et al.*, 2014).

Les écosystèmes de mangrove sont des sites d'importance majeure dans le cycle des éléments biotiques principaux (C, N, P). Grâce à leur grande surface d'échange, aux capacités de filtration des nutriments par la végétation et aux fortes capacités d'absorption des sols, ces écosystèmes participent activement au piégeage des nutriments et à la minéralisation de la matière organique et des matières en suspension des eaux estuariennes et côtières (Ewel *et al.*, 1998). Ils maintiennent ainsi la qualité des eaux estuariennes et côtières par le piégeage du



carbone organique dissous, de l'azote, et du phosphore (M. Wang *et al.*, 2010). Les mangroves ont une productivité très élevée et représentent une des principales sources de matière organique dans les eaux côtières grâce à l'apport de litière de feuilles (40 à 95 % de l'apport total de litière) et de carbone organique dissous (Mohamed *et al.*, 2016). Elles contribuent ainsi à fournir la matière organique nécessaire aux différents réseaux trophiques comme les communautés de détritivores et de décomposeurs (Komiyama *et al.*, 2000). Elles ont un rôle nourricier important pour la faune, en particulier pour les crabes consommateurs de feuilles qui enfouissent la litière dans leur terrier avant de la consommer (Mandura, 1997).

De plus, les mangroves ont un fort potentiel dans l'atténuation des changements climatiques *via* la séquestration et le stockage du carbone atmosphérique qui sont possibles grâce à une production primaire et une sédimentation élevées. Ces caractéristiques font des mangroves d'excellents puits de carbone dans les tropiques (Komiyama *et al.*, 2008; Donato *et al.*, 2011; Alongi, 2012). Elles peuvent séquestrer environ 22,8 millions de tonnes de carbone par an (Giri *et al.*, 2011). Elles stockeraient 3 à 5 fois plus de carbone organique que les forêts terrestres (Donato *et al.*, 2011). L'accumulation de carbone dans les sédiments provient de deux sources principales : les sources allochtones et autochtones. La première source de carbone, dite allochtone, comprend les apports de matières organiques déposées par les cours d'eau en amont des mangroves et transportées par les courants marins. Les mangroves reçoivent chaque jour des entrées d'eau salée provenant des mers et océans, ainsi que des entrées d'eaux douces, de sédiments, de nutriments et de dépôts de limon drainés par les rivières. La seconde source, dite autochtone, provient de la séquestration du carbone par la chute de litière et la croissance de racines souterraines fines (Saintilan *et al.*, 2013). Les sources autochtones contribuent à environ 70 % de la production primaire nette des mangroves (Bouillon *et al.*, 2008). Enfin, les mangroves participent à l'enrichissement des mers et des océans en carbone par exportation de carbone total. Elles ne couvrent que 0,1 % de la surface continentale de la Terre mais représentent 11 % de l'apport total de carbone terrestre dans l'océan (Jennerjahn et Ittekkot, 2002) et 10 % du carbone organique dissous exporté vers les océans (Dittmar *et al.*, 2006).

L'ensemble des services écosystémiques rendus par les mangroves révèle leur importance pour la planète. Elles ont aussi une valeur économique non négligeable en particulier pour le commerce de poissons et de crevettes. Les bénéfices des services écosystémiques s'élèveraient par exemple à 900 000 dollars américains pour 1800 hectares de mangroves au Cambodge (UNEP, 2013) ou 1,6 milliards de dollars par an pour les Etats-Unis (Lewis *et al.*, 2011) et de

2 060 à 9 270 dollars américains par an et par hectare pour l'ensemble des services écosystémiques dans le monde entier (Spalding *et al.*, 2010).

#### 2.2.5. Un environnement menacé

Malgré leur importance, les mangroves font partie des écosystèmes tropicaux les plus menacés au monde, les mangroves d'Asie étant particulièrement concernées. Les premières estimations de la surface mondiale de mangroves datent de 1980, elles ont été menées par l'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO, Food and Agriculture Organisation of the United Nations) et le programme UNEP (United Nations Environment Programme). Lors de cette étude, les mangroves s'étalaient sur une surface mondiale de 15,6 millions d'hectares représentant 51 pays (FAO, 2007). Après l'évolution des mesures de cartographies et le recensement de nouvelles mangroves, une étude menée par Spalding *et al.* (1997) a estimé un recouvrement mondial des mangroves de 18,1 millions d'hectares sur 112 pays. Puis les estimations se sont basées sur des études entre 1997 et 2005 (FAO, 2007; Spalding *et al.*, 2010; Giri *et al.*, 2011). D'après ces études les mangroves s'étendraient sur des surfaces allant de 13,7 à 15,2 millions d'hectares sur 120 pays et territoires. Hamilton et Casey (2016) ont réévalué les surfaces de répartition des mangroves avec des techniques plus performantes et comparé leurs résultats aux mesures de Giri *et al.* (2011) pour l'année 2000. En 2000, les mangroves ne couvraient en réalité que 83 495 km<sup>2</sup> au lieu de 137 760 km<sup>2</sup> soit une perte de 39 % des mangroves. Hamilton et Casey (2016) ont estimé qu'en 2014, les forêts de mangrove se répartissaient dans 105 pays, soit une surface mondiale de 81 484 km<sup>2</sup> (8 millions d'hectares) dont 69 761 km<sup>2</sup> représentés par seulement 20 pays. Globalement, selon les auteurs, 1 646 km<sup>2</sup> de mangroves ont disparu entre 2000 et 2014 soit 1,97 % de perte totale à la surface de la Terre (Hamilton et Casey, 2016).

Actuellement 32 % des mangroves auraient disparus depuis les années 80 (119 278 km<sup>2</sup>, corrigé par Hamilton et Casey (2016)) à cause des activités humaines : déforestation, industrialisation, urbanisation, aquaculture, agriculture, tourisme, (Giri *et al.*, 2011; Lewis *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014), et la surexploitation du bois pour la cuisine, le chauffage et la construction (Alongi, 2002). En Asie du sud-est, la déforestation est très élevée et est principalement liée à une forte augmentation de l'agriculture et de l'aquaculture entre 1996 et 2010 (Thomas *et al.*, 2017). La disparition des mangroves est plus rapide que celle des récifs coralliens et des forêts tropicales (Duke *et al.*, 2007; Alvarenga *et al.*, 2015), elle induit une libération importante de carbone

dans l'atmosphère représentant 10 % des émissions totales résultants de la déforestation (Donato *et al.*, 2011). La pression anthropique n'est pas la seule cause de la disparition des mangroves, à plus grande échelle les changements climatiques peuvent avoir des impacts néfastes importants sur leur répartition à la surface du monde, particulièrement l'élévation du niveau des océans (Gilman *et al.*, 2008). Les changements climatiques peuvent altérer la distribution, l'abondance et la phénologie des espèces, donc avoir des conséquences sur la structure et les fonctions des écosystèmes (Kelleway *et al.*, 2017). L'augmentation globale de la température induite par le réchauffement climatique entraînerait une élévation de l'évaporation et de la salinité dans les sédiments, ceci altérerait les palétuviers et réduirait leur diversité (Huxham *et al.*, 2010). Les mangroves sont fortement menacées par l'élévation du niveau des océans. Ne pouvant pas toujours migrer vers l'intérieur des terres à cause de l'urbanisation, les espèces ne pourront pas s'adapter à la submersion permanente. Au cours du 20<sup>ème</sup> siècle, le niveau des océans s'est déjà élevé de 12 à 22 cm, la tendance est en nette augmentation depuis les dernières décennies. Les estimations prévoient une élévation de 90 à 130 cm supplémentaires d'ici la fin du 21<sup>ème</sup> siècle (Spalding *et al.*, 2010). Certains services écosystémiques pour la protection des côtes et la pêche disparaîtront (López-Medellín *et al.*, 2011). Si les conditions actuelles d'exposition de la mangrove à l'anthropisation et aux changements climatiques n'évoluent pas, les prévisions indiquent que 100 % des mangroves disparaîtraient d'ici les 100 prochaines années, tout comme leur fonction pour les écosystèmes (Duke *et al.*, 2007). Seulement 6,9 % des zones de mangroves sont protégées dans le monde (Giri *et al.*, 2011). En Indonésie où les surfaces de mangrove sont les plus grandes au monde, 69,3 % des mangroves sont considérées comme étant modérément à fortement dégradées, seulement 30,7 % des mangroves sont en bon état (Kusmana, 2014).

En revanche les changements climatiques peuvent avoir un impact positif sur la répartition des mangroves au détriment d'autres écosystèmes. Ils peuvent par exemple entraîner l'expansion des forêts de mangrove dans les zones de marais salants entraînant la disparition progressive de ces derniers (Saintilan *et al.*, 2014). Mais l'impact probable de ce phénomène sur la structure, la fonction et les services de ces écosystèmes n'est pas encore bien connu. Il est supposé que l'expansion des mangroves augmenterait le stockage du carbone et des nutriments, la protection contre les tempêtes et la capacité d'élévation des surfaces en réponse à l'élévation du niveau des océans. Cependant l'expansion des mangroves dans les marais salants conduirait à un déclin de la faune nécessitant des zones ouvertes et une baisse des activités en lien avec la faune (Kelleway *et al.*, 2017).

Plusieurs projets de conservation et de restauration des mangroves ont été mis en place pour lutter contre la disparition des mangroves dans le monde entier. Depuis 2004, l'Océan Indien connaît une augmentation des tsunamis, donc des efforts de protection des mangroves ont été consentis dans plusieurs pays comme l'Inde, l'Indonésie, le Pakistan et le Vietnam (UNEP, 2013). Des technologies existent pour replanter les espèces de palétuviers des mangroves mais il est très difficile de restaurer la faune et les fonctions écosystémiques qui leur étaient associées. De plus 20 à 25 ans sont nécessaires pour retrouver la biomasse, la structure et la productivité d'une mangrove saine (Alongi, 2002). Le choix des espèces de palétuviers est particulièrement important, plusieurs projets de restauration ont échoué par le choix d'espèces inadaptées. Certains projets consistent à planter des mangroves dans des zones où elles n'existaient pas auparavant (Iles Marshall, Polynésie Française, Hawaï, Moyen Orient). Les objectifs sont les mêmes que les projets de restauration à savoir le développement des services écosystémiques fournis par les mangroves (Spalding *et al.*, 2010).

#### 2.2.6. Impact des eaux usées sur les mangroves

De par leur localisation, en bord de côtes continentales ou insulaires, les mangroves sont directement menacées par les changements climatiques et les pressions anthropiques. Le développement des pratiques agricoles et l'aquaculture accroissent le déclin des mangroves le long des côtes au profit de nouvelles zones d'activités. A l'interface entre les agglomérations et la mer, les mangroves sont également soumises aux effluents anthropiques issus des fermes agricoles, des aquacultures, des habitations (eaux usées domestiques), des industries (eaux usées industrielles) et des ports (Delabie *et al.*, 2006; Prasad, 2012; Zhang *et al.*, 2014), du lessivage des sols, et des déversements accidentels de canalisations et bateaux. Parmi les organismes vivant dans les mangroves, les palétuviers, les crabes, la méiofaune et les microorganismes des sédiments sont alors en contact direct avec les polluants anthropiques tels que les métaux lourds, les contaminants organiques, les pesticides (Lewis *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014), les déversements de pétrole (Duke, 2016), et l'excès de nutriments (Bartolini *et al.*, 2011; Molnar *et al.*, 2013).

Les effluents anthropiques peuvent influencer la structure, les fonctions et la productivité des écosystèmes mangroves, et affecter la qualité des eaux côtières (Lewis *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014). L'augmentation de la concentration en nutriments dans les mangroves conduit à des phénomènes d'eutrophisation qui se traduisent par des blooms algaux et de l'anoxie dans les

sédiments (Boonsong *et al.*, 2003). Les mangroves sont particulièrement soumises aux rejets d'eaux usées (EU) contrôlés ou non contrôlés issus des activités humaines (Wong *et al.*, 1995). Leurs effets sur les différents compartiments de la mangrove dépendent du type d'EU rejetées. Dans le cas des eaux industrielles, les métaux lourds et les hydrocarbures sont piégés à long-terme par les sédiments et créent un phénomène de bioaccumulation qui peut devenir plus toxique pour les différents organismes de la mangrove que la présence d'EU domestiques (Tam et Wong, 1995). Pour les hydrocarbures par exemple, leur accumulation peut conduire à des défoliations, une mortalité des arbres, impacter la distribution et la dynamique des microorganismes et de la faune (Olguin *et al.*, 2007; Taketani *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 2011). Les métaux lourds (Cu, Zn, Mn, Cd, Cr, Pb et Hg), quant à eux, peuvent se déposer dans les sédiments et s'accumuler dans les chaînes trophiques (Zhang *et al.*, 2014), en particulier dans les tissus des crabes (Banci *et al.*, 2017) et être absorbés par les racines des palétuviers. Lorsque les milieux sont fortement pollués en métaux, les palétuviers de l'espèce *Avicennia schaueriana*, par exemple, s'adaptent et mettent en place la translocation : les métaux toxiques pour les racines migrent dans les feuilles (Souza *et al.*, 2015). Les métaux peuvent aussi s'accumuler dans les branches, les feuilles ou les fruits. La zone d'accumulation et la concentration accumulée dépendent du métal et de l'espèce de palétuvier (Zhang *et al.*, 2014). En ce qui concerne les crabes, Cu, Pb et Zn semblent s'accumuler plutôt dans l'hépatopancréas tandis que Hg s'accumule dans les muscles des crabes (Reichmuth *et al.*, 2010). Mais ce phénomène de bioaccumulation des métaux ne semble pas causer de dommages morphologiques ou structurels au niveau des feuilles de palétuviers ou au niveau des crabes (Arrivabene *et al.*, 2015; Banci *et al.*, 2017).

L'excès de matière organique provenant des EU modifierait les communautés de la faune des mangroves. Il augmenterait la densité de crabes violonistes (Ocypodidae) alors que la plupart du macro-benthos serait appauvri par la perturbation (Lee, 1995). Les Ocypodidae seraient donc les crabes les moins sensibles à la pollution organique. Dans une mangrove australienne soumise à un gradient d'EU domestiques prétraitées, il a été montré que la distribution des crabes était modifiée à proximité des rejets (Wear et Tanner, 2007). Ceci était accompagné d'une diminution de leur diversité. A l'inverse, la diversité des crabes Ocypodidae et Sesarmidae a été augmentée dans des mangroves péri-urbaines exposées à des EU domestiques (Cannicci *et al.*, 2009). Les crabes de mangrove ont alors été impactés directement et indirectement par les EU, car leur source de nourriture a également été modifiée par les EU : stimulation de la production végétale et de la croissance microbienne (Cannicci *et al.*, 2009;

Wickramasinghe *et al.*, 2009). Penha-Lopes *et al.* (2009a) ont montré que l'exposition aux rejets d'EU domestiques induirait une augmentation de 20 % de la mortalité des crabes dans une mangrove tanzanienne tandis que leurs capacités de reproduction et de fécondité seraient améliorées (Penha-Lopes *et al.*, 2009b). Bartolini *et al.* (2009) ont mis en évidence des changements de comportement chez les crabes en présence d'EU domestiques. Les crabes vivant dans des mangroves exposées favoriseraient leurs activités de cour et de territorialisme au détriment de la bioturbation. La bioturbation étant un facteur important dans le maintien fonctionnel des mangroves, l'absence de bioturbation menacerait l'équilibre de la mangrove (Bartolini *et al.*, 2009).

Les EU influenceraient positivement la richesse et l'abondance de certains macro-invertébrés en augmentant la dominance des oligochètes, des vers et chiromidés (Dyer *et al.*, 2003). En ce qui concerne la méiofaune, seules les densités de nématodes étaient augmentées, les densités des autres organismes formant la méiofaune n'ont pas été modifiées (Gómez Noguera et Hendrickx, 1997; Zhou *et al.*, 2015). Ces organismes seraient particulièrement influencés par les changements environnementaux tels que la granulométrie, l'oxygénation des sédiments, la salinité, et la charge en matière organique (Nagelkerken *et al.*, 2008) et par les entrées de pollution (Giere, 2009). Les rejets d'aquaculture en Nouvelle Calédonie ont augmenté la biomasse et la densité totale de méiofaune (Della Patrona *et al.*, 2016). Mais ils ont été néfastes pour certains taxa rares : les halacaroides, les kinorhynches, les tanaïdacés et les tardigrades (Della Patrona *et al.*, 2016). Cependant l'ensemble de la méiofaune présenterait un fort potentiel de résilience après une courte période d'exposition à une perturbation. Six mois seraient nécessaires pour que la méiofaune se rétablisse et se stabilise, en particulier grâce à l'alternance des marées aidant le lessivage et la resuspension des sédiments de mangrove (Dye, 2006).

En présence d'un excès de N et de P, la dynamique des réseaux trophiques des mangroves serait alors modifiée à la fois par des changements dans la structure des espèces ingénieurs de la mangrove (crabes, méiofaune) (Cannicci *et al.*, 2009) et dans celle des communautés microbiennes (Wickramasinghe *et al.*, 2009). Plusieurs études se sont intéressées à l'impact des EU sur les communautés microbiennes, et les résultats sont contrastés. Par exemple, la croissance des communautés microbiennes a été montrée stimulée en présence de nutriments et de matière organique dans les EU (Tam, 1998). A leur contact, dans des microcosmes de sédiments de mangrove, les quantités de bactéries aérobies et anaérobies hétérotrophes, de nitrifiantes et de dénitrifiantes étaient significativement plus élevées (Tam, 1998). *In situ*, dans une mangrove de Mayotte, les densités des bactéries, des algues vertes et des diatomées étaient

plus élevées en présence des EU (Bouchez *et al.*, 2013). La densité des communautés impliquées dans le cycle de l'azote était également plus élevée dans des mangroves thaïlandaises et chinoises recevant des EU municipales, mais aucun changement n'a été observé dans la structure de ces communautés (Tam *et al.*, 2009; Wickramasinghe *et al.*, 2009). De même, la densité des micro-algues et des cyanobactéries a augmenté sans modification de leur diversité (Tam *et al.*, 2009; Wickramasinghe *et al.*, 2009). Les EU stimuleraient de 2 à 12 fois l'activité des microorganismes impliqués dans l'ensemble des processus du cycle de l'azote dans une mangrove néo-calédonienne exposée aux effluents d'une ferme de crevettes (Molnar *et al.*, 2013). De plus, les EU riches en matière organique et métaux lourds, ayant une salinité de 15 ‰, agiraient davantage sur l'activité microbienne que l'entrée d'EU riches en matière organique et métaux lourds, non salées, suggérant que l'association matière organique et salinité auraient plus d'effet sur les communautés microbienne que les métaux lourds (Tam, 1998). Au contraire, il est récemment observé que l'apport d'azote diminue la densité bactérienne et augmente la densité fongique dans des sédiments de mangrove en microcosme (Luo *et al.*, 2017). Ce phénomène serait lié à des variations de pH et de processus enzymatiques réduisant l'abondance bactérienne, mais ceci induirait une meilleure séquestration du carbone dans les sédiments exposés à l'azote et donc à une meilleure perte de carbone dans les sédiments de mangrove (Luo *et al.*, 2017).

La stimulation de croissance des communautés microbiennes favorise la minéralisation par les microorganismes et conduit à une baisse rapide de l'oxygène dans les sédiments (Brzezinska *et al.*, 2006). Certains taxa de la méiofaune particulièrement sensibles à l'anoxie favorisée ainsi par les EU dans les sédiments pourraient disparaître (Sutherland *et al.*, 2007), indiquant un effet indirect des EU sur ces organismes. Et les palétuviers déjà stressés par l'indisponibilité de l'oxygène dans les sédiments lors de l'immersion par la marée, doivent alors faire face à la diminution des concentrations de ce dernier également à marée basse (Drew, 1997). L'anoxie dans les sédiments inondés entraînerait l'accumulation d'ions réduits potentiellement toxiques tels que  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$  dans l'eau interstitielle. Pour survivre dans ces conditions, les palétuviers doivent développer des réactions particulières comme la perte radiale d'oxygène par les racines ou la formation de plaques de fer à la surface des racines (Visser *et al.*, 2000). La perte radiale d'oxygène par les racines permet aux palétuviers de libérer de l'oxygène dans la rhizosphère pour rétablir des conditions aérobies, oxyder les sédiments, réduire les composés toxiques et tolérer les conditions anoxiques dues aux immersions par la marée (Smolders and Roelofs, 1996; Pi *et al.*, 2010). Ce phénomène génère des précipitations de fer qui se dépose

sous forme oxydée sur les racines et forme des plaques de fer (Visser *et al.*, 2000; Pi *et al.*, 2010). En présence d'un excès d'EU domestiques chargées en nutriments, le nombre de plaques augmenterait également pour agir comme une barrière et limiter la libération excessive d'oxygène (Pi *et al.*, 2010).

Plusieurs autres effets ont été observés sur la végétation en présence d'EU domestiques brutes. Les premières études ont été réalisées dans des parcelles de mangrove en Chine. Elles n'ont pas révélé d'impact significatif sur la structure, la croissance, la biomasse et la mortalité des palétuviers en présence d'EU, ni sur le contenu en carbone organique, N, P et potassium des feuilles au bout d'un an (Wong *et al.*, 1995) ou deux ans d'exposition (Wong *et al.*, 1997). La production et la décomposition de la litière ne seraient pas non plus perturbées au bout d'un an d'exposition de la mangrove aux EU (Tam *et al.*, 1998). L'excès d'N serait bénéfique pour la productivité des mangroves en particulier quand les sédiments sont pauvres en nutriments (Clough *et al.*, 1983), et stimulerait la croissance des palétuviers (Lovelock *et al.*, 2004). La croissance des branches d'arbres à faible croissance et rabougris serait multipliée par deux pour un enrichissement à l'N et par dix pour un enrichissement au P au bout de 10 mois d'exposition d'une mangrove déficiente en nutriments. L'apport de N et de P a réduit la déficience en nutriments de ces palétuviers, et a donc levé la limitation de leur croissance (Lovelock *et al.*, 2004). En arrière mangrove, les palétuviers sont caractérisés par une apparence rabougrie et une croissance faible en réponse à de plus fortes concentrations en sel qu'en bordure de littoral. Ces déficiences leur permettraient de réagir plus fortement à un enrichissement en N que des palétuviers à croissance normale. Le nombre de feuilles par rameaux est augmenté, ainsi que leur taille et le contenu en azote (Martin *et al.*, 2010). A Mayotte, après 12 à 18 mois d'exposition d'une mangrove aux EU domestiques prétraitées, Herteman *et al.* (2011) ont montré une augmentation de la croissance de la végétation (diamètres et hauteurs des arbres, longueurs des rameaux et des propagules, mesures des surfaces foliaires). Ils ont aussi relevé une augmentation significative de la concentration de l'ensemble des pigments foliaires, des taux de photosynthèses et d'évapotranspiration (Herteman *et al.*, 2011). Des résultats similaires pour la croissance de la végétation ont été observés dans des parcelles de mangroves en Thaïlande exposées aux EU municipales et agricoles (Wickramasinghe *et al.*, 2009) et dans des microcosmes exposés aux EU pendant 6 mois (Wu *et al.*, 2008). En présence des EU, certains palétuviers déclenchent la formation de leurs structures reproductrices (fleurs, fruits) (Agraz Hernandez *et al.*, 2011).



Certaines études se sont intéressées aux effets à long-terme sur la végétation des mangroves exposées à de fortes salinité et aridité, après 15 ans d'exposition à des EU (Mandura, 1997) ou après 3 à 12 ans d'enrichissement en N ou P (Lovelock *et al.*, 2009). La présence à long-terme des EU a diminué la densité des pneumatophores d'*Avicennia marina*, unique espèce de palétuviers composant la mangrove de Djeddah (Arabie Saoudite). La proportion de pneumatophores morts ou aberrants a fortement augmenté, entraînant des dommages importants pour la respiration des racines, l'assimilation de l'azote et la croissance des arbres (Mandura, 1997). Lovelock *et al.* (2009) ont montré dans plusieurs mangroves que les enrichissements en N et P stimulaient la croissance des arbres mais aussi leur mortalité. En effet d'après les auteurs, l'enrichissement en nutriments stimulerait la croissance des branches au détriment des racines, rendant les palétuviers plus vulnérables au vent et à l'énergie des vagues. La disparition des palétuviers pourrait impacter fortement le fonctionnement global de la mangrove.

Malgré une perturbation anthropique constante, les mangroves semblent résister à ces contaminations sans rupture fonctionnelle ni déséquilibre biologique (Saenger, 2002; Holguin *et al.*, 2006). De plus les mangroves seraient plus résistantes aux phénomènes d'eutrophisation par excès de nutriments que d'autres milieux aquatiques (Nedwell, 1975).

#### 2.2.7. Bio-épuration des eaux usées par la mangrove

L'utilisation des mangroves comme système de traitement tertiaire des eaux usées a été suggéré pour la première fois par Corredor et Morell (1994) dans le but d'éliminer les nitrates. Puis le potentiel des mangroves comme exutoire aux rejets d'eaux usées a largement été étudié lors d'expérimentations conduites en milieu naturel dans des mangroves de Hong Kong en Chine ou dans des mésocosmes (Tam et Wong, 1995, 1996, Wong *et al.*, 1995, 1997; Tam, 1998; Tam *et al.*, 1998, 2009). Comme dans les procédés d'assainissement en filtres plantés, l'association entre le système de filtration de la végétation et l'activité des microorganismes dans les sédiments permet de réduire les polluants présents dans les eaux usées (Wong *et al.*, 1995).

Tam et Wong (1995, 1996) ont montré que les sols de mangroves sont capables de piéger le phosphore et les métaux lourds (Cu, Zn, Cd, Ni, Mn, Zn et Cr) des eaux usées. Puis Wu *et al.* (2008) et Tam *et al.* (2009) ont mis en évidence la capacité des mangroves à éliminer l'azote et la matière organique, indiquant ainsi que les mangroves sont de bonnes alternatives au traitement des eaux usées en station d'épuration. La diversité des communautés impliquées dans

le cycle de l'azote a augmenté dans une mangrove choisie pour recevoir des EU municipales. Ces organismes joueraient un rôle important dans l'élimination de l'azote dans les EU. L'élimination de l'azote des eaux usées serait liée à des processus de nitrification, de dénitrification et d'anammox (Wickramasinghe *et al.*, 2009) rendant possible l'assimilation d'une partie de l'azote par les plantes. D'après Lambs *et al.* (2011), 42 à 64 % de l'azote transporté par les eaux usées sous forme d'ammonium serait piégé dans les sédiments et capté par la végétation. Wu *et al.* (2008) ont montré de forts potentiels d'élimination du carbone organique dissous (de 70 à 76 %), de l'ammonium (de 76 à 94 %), de l'azote inorganique (de 48 à 63 %), de l'azote Kjeldahl total (de 75 à 79 %), des ortho-phosphates (> 97 %) et du phosphore total (de 87 à 92 %).

Les rejets d'eaux usées en mangrove ne semblent pas altérer la structure de la végétation ni la composition de leur feuillage (Wong *et al.*, 1995, 1997), ni leur productivité (Tam *et al.*, 1998) au bout d'un an d'exposition. Les plantes semblent bénéficier de l'excès de nutriments et croissent plus rapidement (Herteman *et al.*, 2011) mais de potentielles conséquences ont été révélées sur la faune exposée aux eaux usées (Cannicci *et al.*, 2009; Penha-Lopes, Bartolini, *et al.*, 2009; Penha-Lopes *et al.*, 2010) et sur la végétation (Tam *et al.*, 2009). Les communautés microbiennes, florales et fauniques clés de la mangrove présenteraient une certaine stabilité en présence d'une forte quantité de nutriments et de matière organique. L'apport de nutriments supplémentaire serait corrélé avec une augmentation de la croissance des mangroves, de la diversité de la faune et des communautés microbiennes (Wickramasinghe *et al.*, 2009).

Cependant, peu d'études se sont intéressées à l'impact à long terme de la bio-épuration des eaux usées par les mangroves. Lovelock *et al.* (2009) ont démontré que des enrichissements en azote et phosphore pendant 3 à 12 ans conduiraient à une augmentation de la mortalité des arbres et à une détérioration de la canopée. De plus, le stockage à long terme des métaux lourds des eaux usées industrielles par la mangrove peut être problématique pour l'ensemble des organismes de la mangrove (Tam et Wong, 1995). De lourdes conséquences sur les palétuviers ou les espèces ingénieurs pourraient modifier le fonctionnement global de l'écosystème mangrove et altérer l'ensemble des compartiments de la mangrove, ainsi que les services écosystémiques associés à la mangrove.

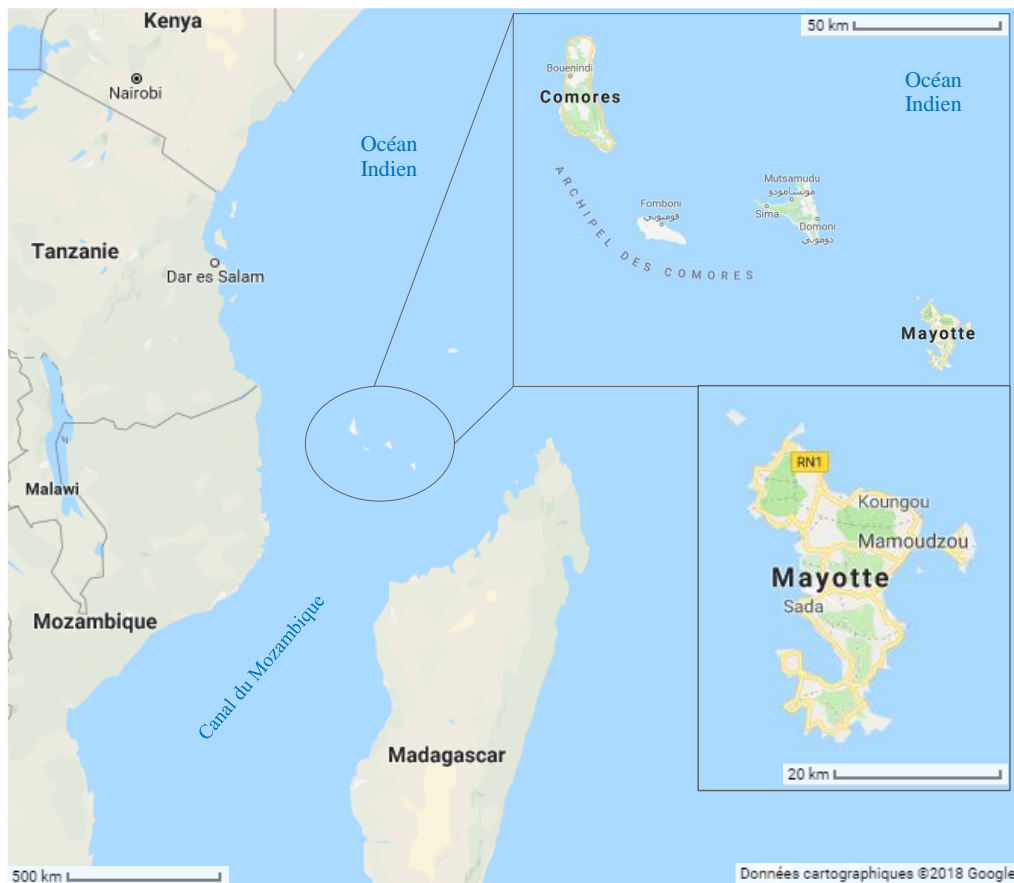
## **Chapitre 2 : Contexte et site d'étude**



## 1. L'île de Mayotte et contexte d'étude

### 1.1. Caractéristiques et localisation géographique

L'île de Mayotte est un département français situé dans l'archipel des Comores dans l'Océan Indien, au Nord du Canal du Mozambique, entre Madagascar et le continent africain (**Figure 14**).



**Figure 14.** Localisation de l'île de Mayotte dans l'Océan Indien.

C'est une petite île volcanique datant de 8 millions d'années, la plus vieille de l'archipel des Comores. Elle est composée de deux îles principales (Grande Terre et Petite Terre) et d'une trentaine d'îlots d'origines volcaniques ou coralliennes. L'ensemble représente 374 km<sup>2</sup> de terres émergées. Mayotte est ceinturée par une barrière récifale de type « rubané » presque continue de 197 km de circonférence, dont une partie immergée au Nord de l'île de 40 km (Rolland *et al.*, 2005) (**Figure 15**). La barrière récifale délimite alors un lagon de 1500 km<sup>2</sup>, un des plus vastes lagons de l'Océan Indien, mais aussi un des plus riches en biodiversité. Le littoral et le lagon mahorais abritent plus de 2300 espèces dont 254 espèces de coraux durs, plus

de 530 espèces de mollusques, 600 espèces de poissons, et 270 espèces d'algues. Cinq des sept espèces mondiales de tortues marines ont été recensées dans le lagon à Mayotte dont deux espèces s'y reproduisent et s'y alimentent toute l'année, la tortue verte et la tortue imbriquée. Le lagon abrite également 22 espèces de mammifères marins (cétacés et dugong) représentant 30 % des espèces de mammifères mondiales (Rolland *et al.*, 2005; DINHUT *et al.*, 2008).



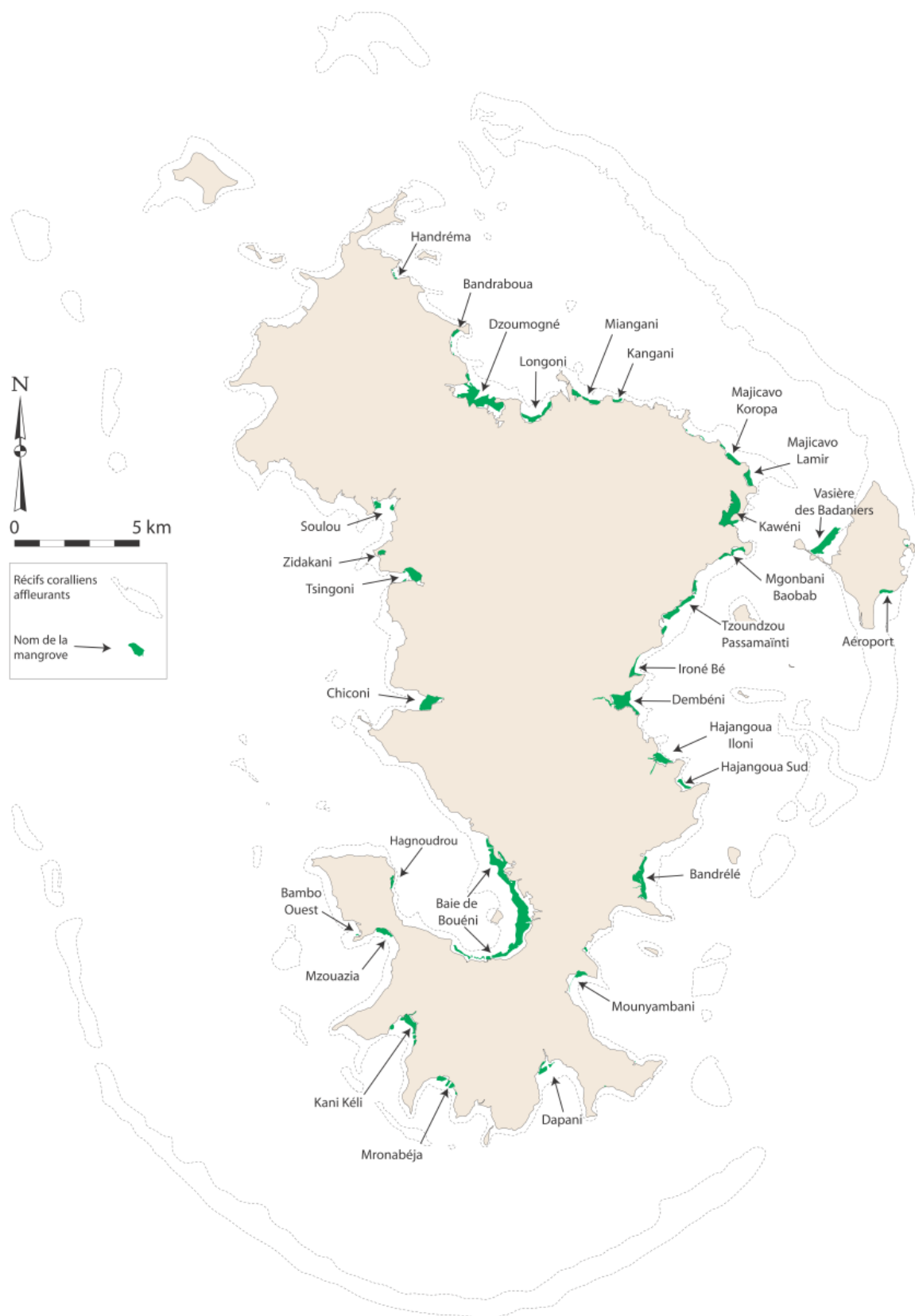
**Figure 15.** Vue satellite de la barrière récifale bordant le lagon de l'île de Mayotte (source Géoportail).

D'un point de vue climatique, Mayotte est soumise à un climat tropical humide avec deux saisons fortement influencées par l'environnement maritime et la direction des vents. Les températures moyennes journalières varient en fonction des saisons entre 20 et 32°C et les précipitations sont abondantes avec plus de 1500 mm de pluies par an en moyenne. La saison des pluies ou « mousson » s'étend de novembre à avril. C'est l'été austral. Les vents provenant du Nord de l'Océan Indien (dénommés localement *Kaskasi et Miombéni*) amènent des masses d'air chaudes et humides (de 23 à 32°C), des pluies abondantes (70 % de la pluviométrie à l'année) et plus rarement des dépressions tropicales et des cyclones. La saison sèche et tempérée ou « d'alizés » s'étend entre juin et septembre. C'est l'hiver austral. Les vents provenant du Sud (*Koussi et Matoulai*) assèchent l'air, diminuent les précipitations, et abaissent les températures (de 20 à 29°C). Ces deux saisons sont séparées par deux intersaisons plus brèves : avril-mai et octobre-novembre (Jeanson, 2009).

## 1.2. Les mangroves à Mayotte

Mayotte fait partie de l'aire de répartition des mangroves Indo-Pacifique-Ouest, la plus riche en termes de diversité de palétuviers. Le littoral de Grande Terre est particulièrement découpé, sur une longueur totale de 265 km. Il est composé de falaises et de nombreuses anses sableuses formant des baies sablo-vaseuses au fond desquelles s'établissent des mangroves de fond de baie, en particulier sur les côtes Sud-Ouest de l'île (baie de Bouéni, de Kani-Kéli, de Chiconi) (**Figure 16**). Les mangroves se répartissent également sur le littoral, dans les zones protégées par les récifs coralliens. Les mangroves littorales ou de front de mer sont fréquentes sur la côte Nord-Est de l'île, comme par exemple à Tsoundzou, Kawéni, Majicavo et Miangani (**Figure 16**). En revanche la pointe Nord-Ouest de l'île est dépourvue de mangrove car les baies ne sont pas assez profondes et la côte n'est pas suffisamment protégée par la barrière de corail (Jeanson, 2009; Thongo, 2016) (**Figure 16**). Les mangroves de Mayotte s'étendent sur une surface totale de 735 ha (26 % du linéaire côtier) soit 120 sites de quelques dizaines de mètres carrés à presque 200 ha (Laulan *et al.*, 2006; Thongo, 2016).

Les mangroves mahoraises sont colonisées par 7 espèces de palétuviers caractéristiques des mangroves de Madagascar et de l'Afrique de l'Est. Parmi les espèces présentes à Mayotte *Lumnitzera racemosa* et *Xylocarpus granatum* sont les palétuviers les moins répandus, alors que *Sonneratia alba* en front de mer et les Rhizophoracées *Rhizophora mucronata* (dans 80 % des mangroves de l'île), *Ceriops tagal* et *Bruguiera gymnorhiza* plutôt en position interne, caractérisent la plupart des mangroves mahoraises. L'espèce *Avicennia marina* habituellement présente en bord de tanne est une espèce ubiquiste qui peut s'installer des mangroves pionnières aux tannes. Les 7 espèces sont constitutives des mangroves installées sur sol vaseux alors que les mangroves sur fonds rocheux sont dominées par seulement 3 espèces : *S. alba*, *R. mucronata* et *B. gymnorhiza* (Thongo, 2016). Les mangroves sont bordées par l'arrière mangrove marécageuse et non salée.



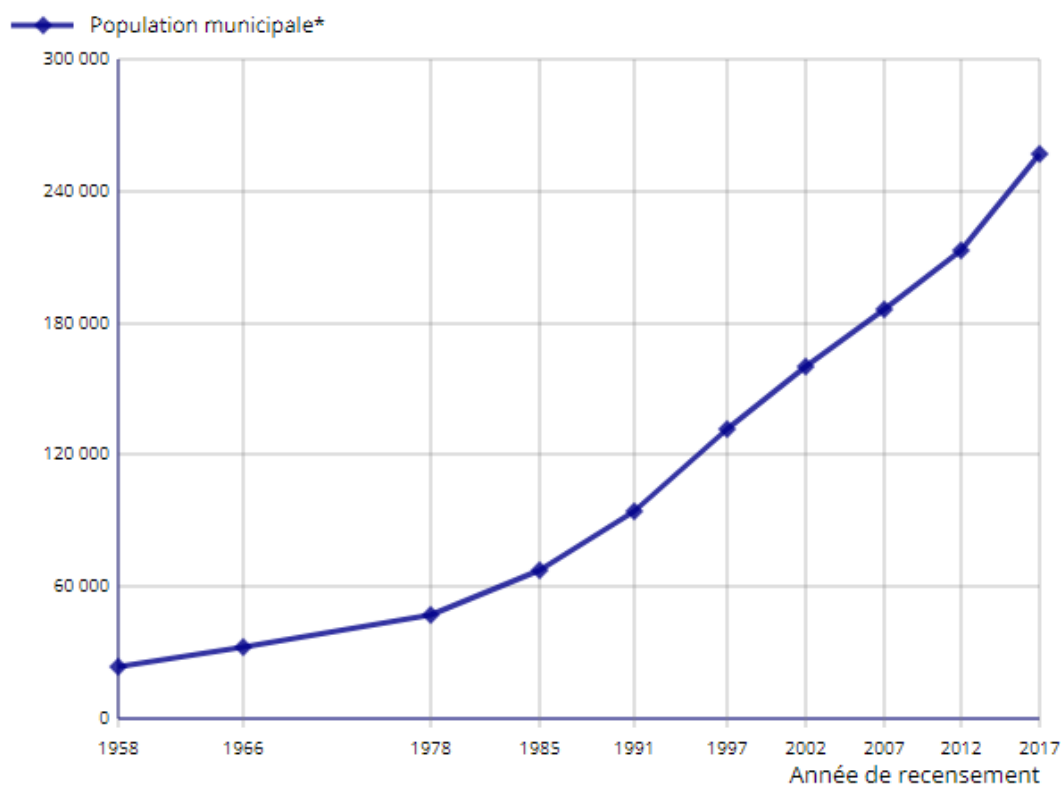
**Figure 16.** Répartition des mangroves (en vert) sur le littoral de l'île de Mayotte (modifié d'après (Laulan *et al.*, 2006; Jeanson, 2009)). Le carré rouge représente le site d'étude à Malamani dans la Baie de Bouéni.



Les mangroves de Mayotte abritent une large diversité d'espèces d'oiseaux (13 espèces endémiques), de crustacés (15 espèces de crabes des mangroves), de mollusques (huitres fixées sur les *S. alba* et le gastéropode *Terebralia palustris*), de poissons (juvéniles pour la plupart) et de chiroptères (chauve-souris de petite taille et roussettes) (Abdallah and Eymard, 2012; Thongo, 2016).

### 1.3. Systèmes d'assainissement à Mayotte

L'île de Mayotte doit faire face à une forte croissance démographique depuis les années 80 (**Figure 17**).



**Figure 17.** Evolution de la population de l'île de Mayotte depuis 1958 au dernier recensement en 2017 (INSEE, 2017). La population municipale représente la somme des personnes résidant sur le territoire de Mayotte (2 îles) de nationalité française ou étrangère en situation régulière ou irrégulière.

En effet, la population mahoraise de 67 167 habitants en 1985 a presque été multipliée par quatre en 2017, avec désormais une population de 256 518 habitants (INSEE, 2017). De 2012 à 2017, la population s'est accrue de 3,8 % par an en moyenne, ce qui correspond à une hausse

plus rapide qu'entre 2007 et 2012 (+ 2,7 % par an) (**Figure 17**). Mayotte est le département français ayant la plus forte croissance démographique et la plus forte densité des départements hors Ile de France avec 690 habitants au km<sup>2</sup> (INSEE, 2017). Cette explosion démographique est principalement liée à la natalité élevée (indice de fécondité de 5 enfants par femme (4,1 en 2012) contre 1,7 en métropole) et à une forte immigration illégale provenant des îles voisines (Comores, Madagascar) (INSEE, 2017). En 2016, 9 500 enfants sont nés à Mayotte, le plus haut niveau jamais enregistré, soit une augmentation de 45 % entre 2013 et 2016. Les ¾ de ces enfants ont une mère de nationalité étrangère (INSEE, 2017).

Cette explosion démographique entraîne un développement urbain important essentiellement sur le littoral et une hausse de la consommation totale en eau (170 m<sup>3</sup> par habitants) et donc une augmentation de la quantité d'eaux usées domestiques (EUD) produite. Or Mayotte est confrontée à des problèmes fonciers, économiques et environnementaux ne facilitant pas la mise en place de systèmes d'assainissement conventionnels tels que des stations d'épuration des EUD. Le climat humide et tropical de l'île et le brassage par l'air marin corrodent les infrastructures collectives classiques (STEP) et leur entretien est coûteux. De plus, les débits à infiltrer dans le sous-sol à l'échelle des STEP sont trop importants et nécessitent des surfaces d'infiltration non disponibles ou saturées en eau en saison des pluies. Enfin, le réseau hydrographique de Mayotte est peu développé, les débits des rivières sont faibles, particulièrement dans le sud de l'île, et interrompu quasi-totalement ou totalement en saison sèche.

L'assainissement à Mayotte est exercé depuis 1998 par les Syndicat Intercommunal d'Eau et d'Assainissement de Mayotte (SIEAM). Seulement deux stations d'épuration classiques ont été mises en place pour collecter et traiter les EUD de l'île, mais cela reste largement insuffisant pour assurer l'assainissement dans toute l'île. Le taux de raccordement des foyers à l'assainissement collectif ou semi-collectif est faible, 85% des habitations ne sont pas raccordées (Thongo, 2016). Les effluents des zones fortement urbanisées rejoignent les eaux souterraines ou de surface après un passage ou non dans une fosse. Seulement 6 % des 120 mini-stations d'épuration mises en places dans des lotissements sont aux normes et fonctionnent correctement (Thongo, 2016). Globalement, la plupart des EUD s'écoulent librement dans les rivières et les mangroves jusqu'au déversement dans le lagon sans réel traitement préalable. Ce qui entraîne des conséquences dramatiques pour l'environnement, particulièrement pour la biodiversité du lagon, et pour la santé publique. Il est donc indispensable de traiter les EUD de

manière efficace afin de préserver durablement la qualité des eaux du lagon et de l'écosystème dans sa globalité.

Le 31 Mars 2011, l'île de Mayotte est devenue le 101<sup>ème</sup> département français. Suite à cette décision, Mayotte est rentrée dans l'Union Européenne en 2014 où elle a changé son statut de pays et territoire d'outre-mer contre celui de région ultrapériphérique (décision 2012/419/UE du Conseil européen le 17 Décembre 2013). Suite à son entrée dans l'Union européenne, l'assainissement des EUD à Mayotte est soumis aux mêmes législations et réglementations que la métropole. Mayotte a jusqu'au 31 décembre 2027 pour respecter les mesures exigées par la directive 91/271/CEE du Conseil de l'union européenne (directive européenne n°2013/64/UE) : équipement de toutes les agglomérations de l'île en systèmes de collecte des eaux urbaines résiduelles (EUR) et mise en place d'un traitement secondaire ou d'un traitement plus rigoureux des EUR avant leur rejet dans l'environnement. Pour remédier aux difficultés de traitement des EUD à Mayotte, et aux problèmes sanitaires et environnementaux engendrés, le SIEAM explore des techniques alternatives adaptables au contexte mahorais. Plusieurs communes ont installé des systèmes d'assainissement extensifs : 2 systèmes de lagunages naturels et 5 systèmes de filtres plantés. L'utilisation des mangroves comme exutoire pour les EUD traitées pourraient être une solution alternative efficace et applicable aux régions tropicales.

## 2. Description du site d'étude

C'est dans ce cadre que depuis 2008, un projet pilote d'assainissement *in situ* associant le SIEAM et le laboratoire EcoLab (Toulouse) vise à valider le principe de l'utilisation de la mangrove de Malamani comme un exutoire pour le rejet d'EUD prétraitées par décantation-digestion. Le projet « Mangrove et Bioremédiation » a été mis en place afin de répondre à un double objectif dans le cadre de la thèse de Mélanie Herteman (2010) qui était : (i) évaluer les capacités épuratrices de la mangrove de Mayotte vis-à-vis d'EUD, (ii) valoriser et protéger cet écosystème à grande valeur écologique et patrimoniale, soumis à une forte pression anthropique.

Le site d'étude a été implanté dans la plus importante mangrove de Mayotte (182 ha), au Sud-Ouest de l'île dans la baie de Bouéni (**Figure 16**). Elle se développe en effet sur plus de 7 km de côte, du village de Poroani au nord jusqu'au-delà du village de Tsimkoura au sud, en passant par Malamani et Chirongui (Thongo, 2016). Sa largeur est variable et peut atteindre jusqu'à

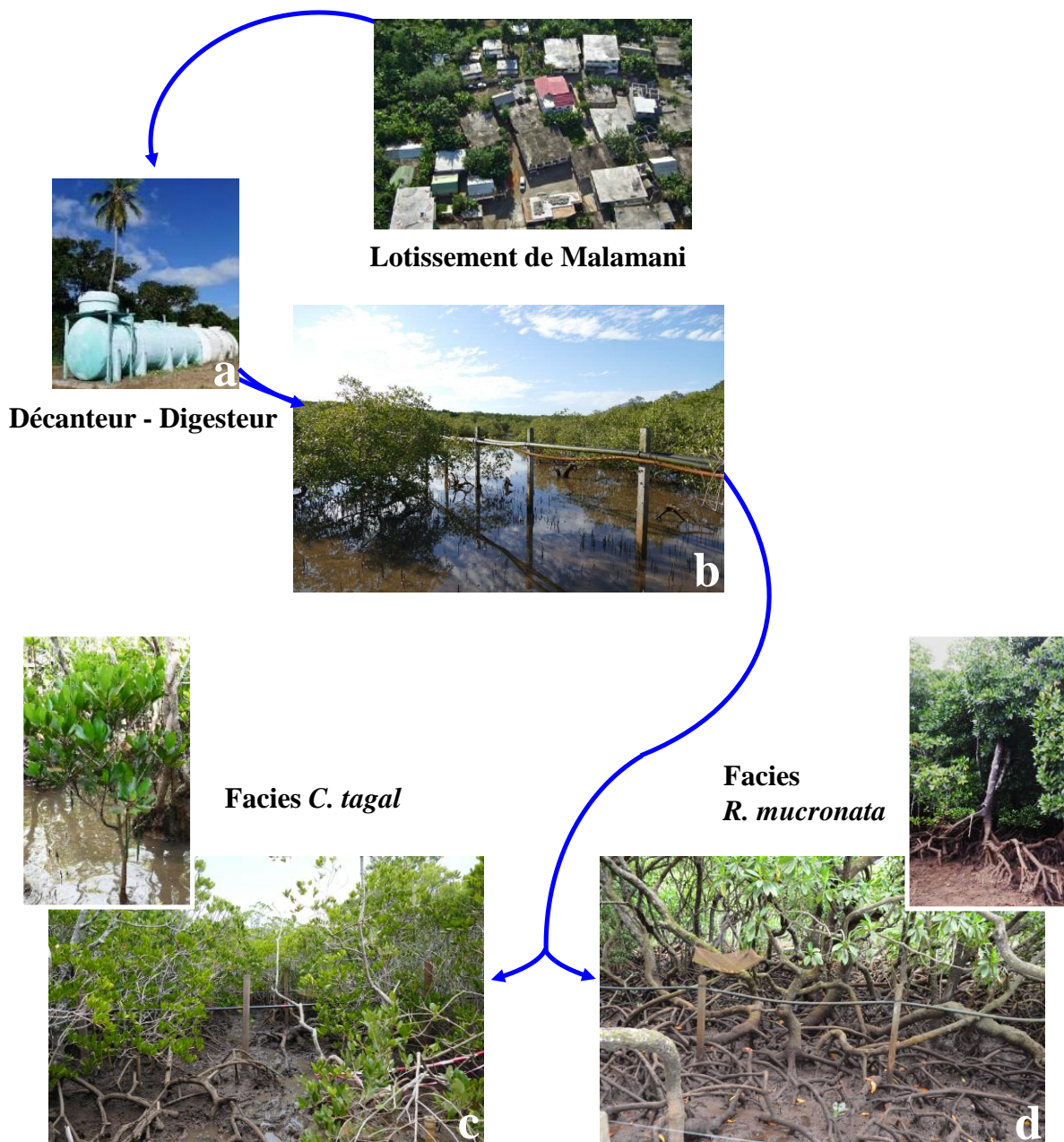
600 m au centre de la baie (Jeanson, 2009). Le village de Malamani est situé au bord de la mangrove, face à l'îlot de Karoni (**Figure 18**).



**Figure 18.** Localisation du village de Malamani et du site d'étude par rapport à la mangrove de la Baie de Bouéni (source Géoportail).

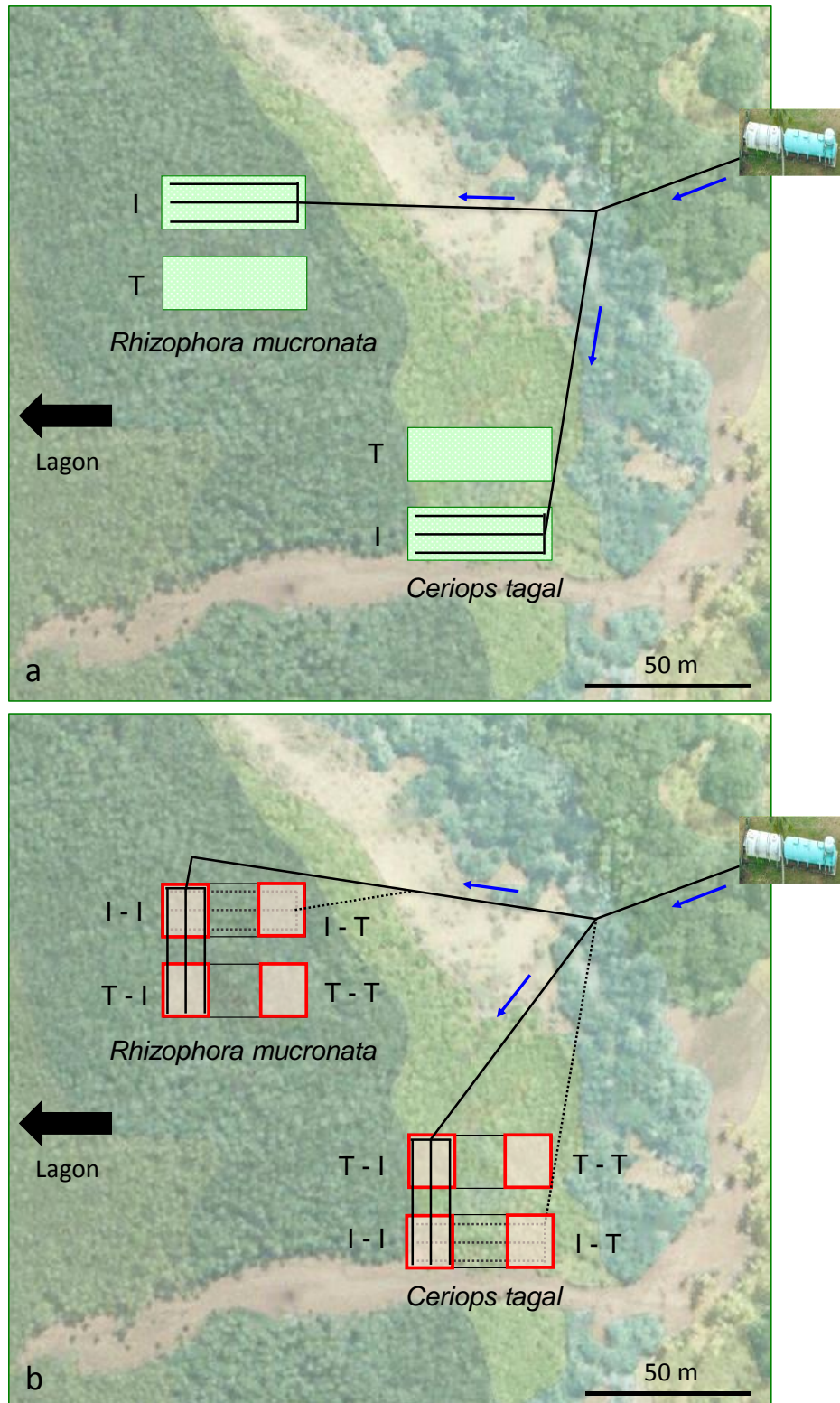
Depuis Avril 2008, les EUD d'un lotissement du village de Malamani représentent une charge journalière de 250 EqH sur la base de 45 g de  $\text{DBO}_5 \cdot \text{j}^{-1}$  et  $100 \text{ L} \cdot \text{j}^{-1}$ . Elles sont collectées et stockées dans une unité de traitement primaire appelée le décanteur-digester (**Figure 19**) dans le but d'éliminer 50 % des MES correspondant à un abattement de la matière organique carbonée exprimée par l  $\text{DBO}_5$  de l'ordre de 30 %. Les eaux prétraitées par digestion anaérobie passent ensuite dans un bassin tampon servant de bassin de stockage (**Figure 19**). Puis les EUD sont acheminées par un réseau aérien de tuyaux vers deux parcelles de mangrove ( $45 \text{ m} \times 15 \text{ m}$  chacune, soit  $675 \text{ m}^2$ ) dites « impactées », dominées soit par les arbres *Rhizophora mucronata* (faciès *R. mucronata*) soit par les arbres *Ceriops tagal* (faciès *C. tagal*) (**Figure 19 et 20a**). Un volume de  $10 \text{ m}^3$  d'EUD (charge hydraulique  $14,8 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$ ) est alors déversé dans chacune des deux parcelles « impactées » par aspersion lente, au moyen de 3 rampes de tuyaux percés tous les 2 m, pendant une heure avant la marée basse afin de favoriser l'infiltration dans le sédiment et éviter l'écoulement direct dans le lagon. Les rejets sont effectués une fois par jour afin d'éviter un ennoiment trop important des terriers de crabes. Les eaux usées rejetées dans les parcelles de mangroves sont d'origine domestique mais elles peuvent être contaminées par des eaux de ruissellement en saison des pluies donc contaminés par des traces de métaux lourds et

de pesticides. L'excédent d'EUD prétraitées est rejeté dans une troisième parcelle non suivi expérimentalement.



**Figure 19.** Acheminement des eaux usées du lotissement de Malamani vers la mangrove en passant par l'unité de traitement primaire (décanteur – digesteur) (a), puis le tanne (b), avant le déversement dans chacune des parcelles impactées du faciès *C. tagal* (c) et *R. mucronata* (d). Les flèches bleues indiquent le cheminement des eaux usées.





**Figure 20.** Représentation du dispositif expérimental de distribution des eaux usées domestiques prétraitées dans les faciès de mangrove *C. tagal* et *R. mucronata*, par des tuyaux (en noir), (a) d’Avril 2008 à Octobre 2015 (I : parcelle impactée, T : parcelle témoin) et (b) d’Octobre 2015 à aujourd’hui (I – I : parcelle impactée avant et après Octobre 2015, I – T : parcelle impactée avant Octobre 2015, ne recevant plus les rejets à partir de Octobre 2015, T – I : parcelle témoin avant Octobre 2015 et impactée après Octobre 2015, et T – T : parcelle témoin avant et après Octobre 2015).

Depuis le lancement des rejets, les deux parcelles impactées sont comparées à deux parcelles témoins ne recevant pas les rejets dans chaque faciès de végétation (**Figure 20a**). Chaque parcelle impactée est espacée de sa parcelle contrôle de 15 m permettant d'éviter les écoulements des rejets entre les deux parcelles. Les parcelles du faciès *R. mucronata* sont à environ 400 m du lagon (**Figure 20a**). Les parcelles du faciès *C. tagal* sont légèrement plus éloignées du lagon, à environ 500 m, elles sont alors moins soumises au balancement des marées (53 minutes d'immersion par jour pour *C. tagal* et 4,3 heures par jour pour *R. mucronata*) (**Figure 20a**). Ce faciès est plus dense que le faciès *R. mucronata*, il constitué d'arbres *C. tagal* rabougris au développement plus lent que les arbres de la même espèce dans les mangroves continentales et caractérisés par un feuillage plus jaune que les arbres *R. mucronata* (se référer aux photos des deux espèces d'arbres, **Figure 19**).

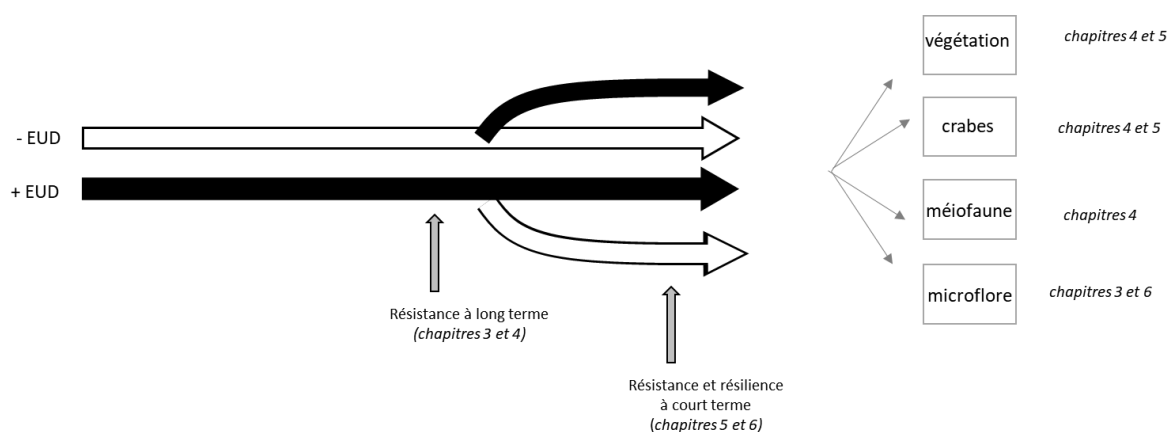
Toutes les mesures, les analyses et les expérimentations ont été conduites dans chacune des parcelles impactées et témoins afin d'une part, de comparer les capacités épuratrices des deux faciès de végétation et d'autre part d'évaluer les éventuels impacts des rejets d'eau usées domestiques sur ces faciès. Pour cela, depuis Avril 2008, cinq collecteurs de litière ont été installés dans chaque parcelle pour suivre la production des feuilles, des fleurs et des fruits de palétuviers dans les deux faciès de végétation. La structure de la végétation a été étudiée dans 4 quadrats d'analyses de 25 m<sup>2</sup> chacun par parcelle pour le faciès *R. mucronata*, et dans 5 quadrats de 4 m<sup>2</sup> chacun par parcelle pour le faciès *C. tagal*. Huit quadrats (de 1 m<sup>2</sup>) ont également été délimités dans chaque parcelle pour suivre la population de crabes. Enfin, quinze piézomètres (de 2 m de profondeur) ont été répartis dans le site d'étude pour caractériser l'hydrologie.

La thèse de Mélanie Herteman (2010) a permis de mettre en évidence la capacité épuratrices de la mangrove de Malamani exposée à des EUD prétraitées pendant 18 mois. Les EUD sont en partie absorbées par les palétuviers, ce qui s'est traduit par une augmentation de la croissance des arbres. En contact avec les EUD, les processus de nitrification et de dénitrification dans les sédiments ont été montrés actifs dans l'élimination de l'azote mais variables selon le faciès de végétation. La structure des communautés de crabes, essentiels dans la réalisation de ces processus, a été modifiée à court-terme par les EUD. De plus, elles ont induit une accumulation du phosphore en profondeur et une infiltration de nitrate dans les eaux de nappe.

### 3. Objectifs du projet de thèse

Suite aux travaux de Mélanie Herteman (2010), la présente thèse (débutée en Octobre 2014) avait pour but de répondre aux deux objectifs suivants (**Figure 21**) :

- Objectif 1 (fondamental) : déterminer la stabilité de la mangrove face à une pression anthropique continue afin d'évaluer la résistance de l'écosystème face à une perturbation à court- ou long-terme et sa résilience après l'arrêt de la perturbation. Cet objectif a été scindé en 2 sous-objectifs de 2 chapitres chacun :
  - Evaluer la stabilité à long-terme de la microflore des sédiments (Chapitre 3), de la végétation et de la faune benthique (crabes et méiofaune) (Chapitre 4).
  - Evaluer les capacités de résistance et de résilience à court-terme de la végétation et des crabes (Chapitre 5) et de communautés microbiennes fonctionnelles spécifiques (phototrophes, nitrifiants, dénitrifiants) (Chapitre 6).
- Objectif 2 (appliqué) : déterminer un cadre technique pour l'utilisation de la mangrove comme exutoire pour les EUD. Cet objectif consistait à définir un plan de rotation des parcelles (durée d'utilisation des parcelles, durée d'arrêt des rejets avant une nouvelle utilisation) et déterminer le faciès de végétation le plus adapté en comparant le potentiel de résistance et de résilience à court et long-terme des faciès *C. tagal* et *R. mucronata* (Chapitre 3, 4, 5, 6).



**Figure 21.** Répartition des chapitres de thèse par compartiment de la mangrove. La résistance des compartiments à long terme a été étudiée à partir de 2012 après une exposition minimale de 4,5 ans. Suite à la modification du système expérimental en 2015, la résistance à court terme des compartiments a été évaluée dès la mise en place des rejets dans la parcelle. Ce changement expérimental a également permis de déterminer la résilience des compartiments après un arrêt des rejets de maximum 2 ans.



Afin de répondre aux objectifs, ma thèse s'est intéressée à l'impact à long terme des EUD sur certains compartiments fonctionnels de la mangrove initialement étudiés par Mélanie Herteman (2010) dans chaque parcelle impactée des faciès de végétation *C. tagal* et *R. mucronata*. Il s'agit de la végétation (structure, diamètre, hauteur, pigments et surface de feuille, production de litière (feuilles, fruits, fleurs)), les crabes (densité et diversité, taille et densité des terriers) et la caractérisation des sédiments (C, N, P total), après 4,5 à 6,5 années d'exposition (**Figure 20a**). La thèse s'est également concentrée sur l'étude de la stabilité à long terme de la méiofaune (diversité, étude des groupes trophiques des nématodes) et de la microflore benthique (diversité et densité totale et des groupes fonctionnels, activité potentielle du cycle de l'azote) après 4,5 à 5 années d'exposition à l'excès de nutriments (**Figure 20a**). En Octobre 2015, le système expérimental de rejet a été modifié pour évaluer la stabilité de l'écosystème après un impact à court-terme, et déterminer les capacités de résistance et de résilience des différents compartiments de l'écosystème mangrove (**Figure 20b**). Les EUD sont désormais déversées perpendiculairement à l'ancien système de rejet. Les 10 m<sup>3</sup> d'EUD prétraitées sont déversés sur 2 parcelles de mangrove de 225 m<sup>2</sup> (15 m x 15 m) dans les deux faciès de végétation *C. tagal* et *R. mucronata* (**Figure 20b**). Elles sont associées à deux parcelles témoins non exposées aux rejets. Donc chaque faciès de végétation est composé de 4 parcelles : une parcelle T - T, qui est une zone n'ayant jamais reçu les EUD, une parcelle I - I, qui est exposée aux EUD depuis Avril 2008, une parcelle T - I, qui est une ancienne zone témoin exposée aux rejets depuis Octobre 2015 afin d'évaluer la résistance à court terme, et enfin une parcelle I - T, exposée aux rejets d'Avril 2008 à Octobre 2015 afin d'évaluer ensuite la résilience (**Figure 20b**). Des campagnes d'échantillonnage ont été réalisées à T0 (Octobre 2015), 3 semaines, 3, 6, 8, 12 et 18 mois après la modification du système de rejets. Sur chaque parcelle, 3 collecteurs de litière ont été installés, 4 quadrats (1 m<sup>2</sup>) ont été positionnés pour le suivi des crabes, et 4 placettes ont été définies pour les prélèvements de sédiments. La végétation (NDVI, pigments et surface de feuille, litière), les crabes (densité et diversité, taille et densité des terriers), les sédiments (C, N, P total), les microorganismes phototrophes (pigments de sédiments) et impliqués dans le cycle de l'azote (densités génomiques, activités potentielles du cycle de l'azote) ont été évalués. Les compartiments ont alors été suivis à long-terme après 7,5 à 9 années d'exposition, à court-terme après 3 semaines, 3, 6, 8, 12 et 18 mois de rejets et la résilience a été suivie après 3 semaines, 3, 6, 8, 12 et 18 mois sans rejets.



**Chapitre 3 : Evaluation de la stabilité de la  
microflore des sédiments de mangrove subissant une  
perturbation sur du long terme**



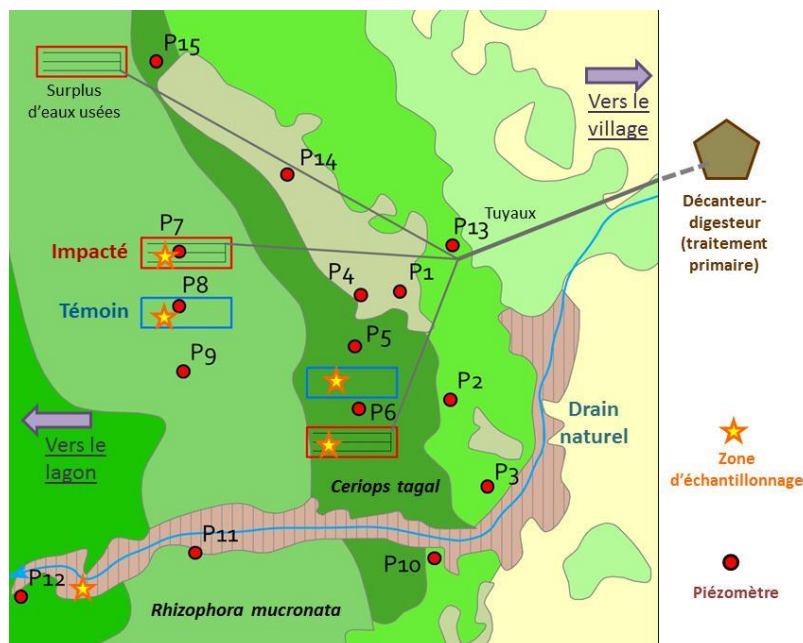
Ce chapitre fait l'objet d'un article scientifique soumis pour publication à la revue *Marine Pollution Bulletin* intitulé :

Biopurification of pretreated domestic wastewaters in mangrove forest: direct and indirect long term effects on microbial communities depend on the dominant vegetation.

Depuis Avril 2008, l'écosystème mangrove de la commune de Malamani (Mayotte, Océan Indien), à l'interface entre une zone urbanisée et le lagon, est exposé de façon contrôlée à des épandages journaliers d'eaux usées domestiques (EUD) prétraitées. Ce dispositif expérimental *in situ* a été mis en place afin de tester la possibilité d'utiliser la mangrove comme exutoire des EUD prétraitées et évaluer son potentiel de bio-épuration. Dès 18 mois d'exposition aux rejets, des effets sur la végétation et les communautés benthiques ont été observés (Herteman, 2010; Herteman *et al.*, 2011).

Suite à ces premiers résultats qualitatifs, l'objectif de ce chapitre est de déterminer l'impact des EUD à long-terme sur la composition et la diversité des communautés microbiennes et de comparer les réponses fonctionnelles de ces communautés en fonction du faciès de végétation et des facteurs environnementaux. Sachant que ces communautés peuvent jouer un rôle prépondérant dans le devenir des polluants contenus dans ces EUD, leur caractérisation nous permet d'appréhender le potentiel de bio-épuration dans ces faciès de mangrove et de disposer d'éléments éclairant le choix de la meilleure zone de végétation à utiliser comme exutoire de ces rejets.

Les EUD provenant d'un lotissement de taille estimée à 250 EqH ont été prétraitées par un décanteur-digesteur, puis acheminées *via* des tuyaux vers la mangrove avant leur rejet dans deux parcelles (675 m<sup>2</sup>) dominées soit par des palétuviers appartenant à l'espèce *Ceriops tagal*, soit par des palétuviers de l'espèce *Rhizophora mucronata*. Chaque jour, pendant 1 h, 10 m<sup>3</sup> d'EUD ont été déversées dans chaque parcelle à marée basse. Chacune de ces parcelles a été comparée à l'évolution naturelle de parcelles dites « témoin » ne recevant pas les rejets. Le plan du site et les lieux d'échantillonnage sont présentés dans la **Figure 22**.

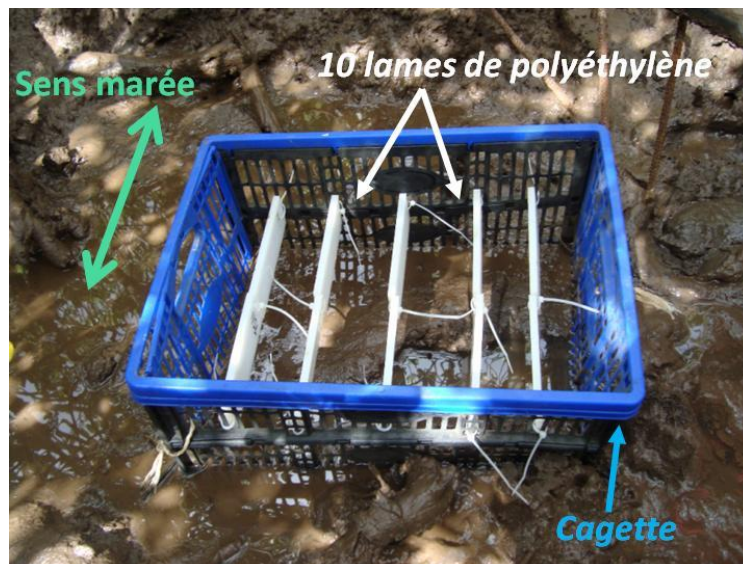


**Figure 22.** Présentation des parcelles d'étude (« impactées » en rouge et « témoins » en bleue) et des zones d'échantillonnage (extrait du rapport de stage de Master 2 de Rémi Torrenta, 2013).

Les campagnes d'échantillonnage ont été effectuées en saison sèche et en saison humide pour prélever du sédiment et le biofilm développé sur des substrats artificiels par des microorganismes capables de coloniser des substrats solides à la surface des sédiments. Dix lames en polyéthylène (15 x 5 x 0,5 cm) ont été placées verticalement (pour éviter l'accumulation de sédiments) près de la surface des sédiments, parallèlement au flux des marées, dans une cagette en plastique ouverte, sur chacune des 4 parcelles de mangrove (**Figure 23**). Les lames ont été récoltées après 3, 6, 9 et 12 jours de croissance du biofilm.

L'ADN de l'ensemble des échantillons a été extrait et utilisé pour des analyses de typage moléculaire. La structure totale des communautés de micro-eucaryotes, de bactéries et d'archées a été évaluée par des analyses en ARISA et en DGGE, ainsi que la diversité (par DGGE), l'abondance (PCR-Q) et l'activité (mesures d'activités potentielles et *in situ*) des bactéries dénitrifiantes et des bactéries (AOB) et des archées (AOA) oxydant l'ammoniac.

En parallèle, la luminosité sous la canopée, la production de litière (feuilles, fruits, fleurs), la densité de terrier des crabes, la salinité et la température des eaux de surface, ainsi que les concentrations en nutriments ont été mesurées dans les 4 parcelles d'étude.



**Figure 23.** Montage expérimental de substrats artificiels disposés sur le sédiment pour chaque parcelle de mangrove (extrait du rapport de stage de Master 2 de Rémi Torrenta, 2013).

Les résultats ont montré qu'après 5 ans d'exposition aux rejets, les EUD ont induit de fortes modifications physico-chimiques du milieu, variables en fonction des saisons et des faciès de végétation. La structure des communautés totales et des communautés fonctionnelles a été modifiée par les rejets. De plus les densités des communautés fonctionnelles et leurs activités ont été augmentées dans les parcelles impactées par les EUD. Enfin, les résultats ont révélé que l'effet des EUD était plus marqué sur les communautés microbiennes du faciès *R. mucronata*.

Bien que des effets marqués des EUD aient été mis en évidence sur les communautés microbiennes après une perturbation à long-terme, les communautés du faciès *C. tagal* ont montré un plus fort potentiel de résistance sans rupture fonctionnelle. Ce faciès serait plus propice pour réaliser la bio-épuration des EUD prétraitées par la mangrove.

# Biopurification of pretreated domestic wastewaters in mangrove forest: direct and indirect long-term effects on microbial communities depend on the dominant vegetation

Cécile Capdeville<sup>a</sup>, Rémi Torrenta<sup>a,b</sup>, Patricia Jargeat<sup>c</sup>, Luc Lambs<sup>a</sup>, François Fromard<sup>a</sup>, Jean-Luc Rols<sup>a</sup>, Joséphine Leflaive<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France

<sup>b</sup>present address : Department of Biology, Université de Moncton, Moncton, NB E1A 3E9, Canada

<sup>c</sup>EDB (Laboratoire Évolution & Diversité Biologique) UMR5174; Université Toulouse 3 Paul Sabatier, CNRS, ENFA, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse

**\*Corresponding author: josephine.leflaive@univ-tlse3.fr**

## Abstract

In Mayotte Island (Indian Ocean) a large-scale and long-term *in situ* experiment has been set-up to test the suitability of mangroves as receptacles for pretreated wastewaters. The present study aimed at comparing the consequences of a 5-year wastewater supply (WS) on the structure of the microbial communities in two mangrove zones colonized by different trees species (*Ceriops tagal* or *Rhizophora mucronata*). Responses of environmental parameters to WS varied according to the mangrove zone, notably for  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations. The structure of functional communities (denitrifying bacteria, ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and archaea (AOA)) were significantly modified by the WS, mainly through  $\text{PO}_4^{3-}$  concentration and temperature variations. The densities of *nosZ* denitrifying bacteria and AOB increased with WS as well as the potential denitrification activity measured during the rainy season. AOA, 15-times more abundant than AOB, responded less to the WS. Microbial communities were more affected in the *R. mucronata* zone.

## Key words

Biopurification, ammonia-oxidizing bacteria, ammonia-oxidizing archaea, denitrification, mangrove

## Highlights

- The ability of mangroves to biopurify pretreated wastewaters was tested *in situ*.
- Wastewater supply for several years induced strong physicochemical modifications.
- Density and structure of functional microbial communities were affected.



- The effect of wastewaters varied according to the season and the mangrove zone.
- These effects were stronger in the *Rhizophora mucronata*-dominated zone.
- Results suggest fast resilience ability of some microbial communities.

## 1. Introduction

Mangroves are unique ecosystems at the interface between land and sea, under tidal influence. These littoral forests, organized in parallel zones of vegetation dominated by a few tree species, cover 60-75 % of the tropical and subtropical coastlines (Holguin et al. 2001). Mangroves are nutrient-poor (Boto and Wellington 1984) but highly productive systems (Alongi 2002) with a high turn-over of organic matter (Nedwell et al. 1994). They are able to trap nitrogen, phosphorus and dissolved organic carbon and may therefore participate to the maintaining of estuarine water quality (Wang et al. 2010). When they are in the vicinity of urban centers or shrimp farms, mangroves are often the receptacle of polluted effluents. Nevertheless, these ecosystems appear to be resistant to urban contaminations (Holguin et al. 2006).

It was suggested very early that mangroves may participate to sewage treatment (Nedwell 1975). Many experimental studies performed to evaluate the capacities of mangroves for bio-purification, notably in China and in the Hong-Kong Region (Tam et al. 1998, Tam and Wong 1995, Wong et al. 1995, Tam and Wong 1996) have shown that mangrove sediments can immobilize phosphorus and heavy metals from wastewaters, with no significant effect observed on the structure, production and nutrient content of vegetation, while microbial growth was enhanced. It was also demonstrated that mangroves significantly contribute to the removal of nutrients and organic matter from wastewater (e.g. Tam et al. 2009). This was more efficient in microcosms with growing plants (Su et al. 2011), with an increase of 50 % of removal efficiency of inorganic nitrogen (Wu et al. 2008). This result was dependent on plant species (Yang et al. 2008). Recently, a large-scale experiment was performed in Mayotte Island (Indian Ocean) where two natural mangrove areas (~675 m<sup>2</sup>) daily received domestic pretreated wastewaters for 18 months. Wastewater supplies increased growth, leaf pigment content, photosynthesis and transpiration rates of mangrove trees (Herteman *et al.* 2011). Stable isotope <sup>15</sup>N tracing demonstrated that 42 to 64 % of the nitrogen found in wastewaters as ammonium in this field experiment was immobilized in the surface soil and taken up by trees (Lambs et al. 2011). Recent investigations also showed the capacities of mangrove soils for the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (Muangchinda et al. 2013).

In addition to N-removal during plant growth, the potential of mangroves for sewage treatment relies in the microbial communities from the sediments. Bacteria account for 91 % of the microbial biomass in mangrove sediments, while algae and protozoa only represent 7 and 2 %, respectively (Alongi 1988). Microbial processes involved in N-cycling are essential for the biopurification of wastewaters. In mangroves, the constant variations linked to tides and the presence of mangrove tree roots provide the alternation of oxic and anoxic conditions. In this context, the microbial processes of nitrogen metabolism encountered are N<sub>2</sub>-fixation, ammonification, nitrification, denitrification, anaerobic ammonium oxidation (anammox) and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA). Though a high diversity of diazotroph microorganisms was detected in mangroves (Dias et al. 2012, Andreote et al. 2012), the loss of N<sub>2</sub> from the systems seems to exceed its fixation, as observed by Fernandes et al. (2012) in Goa (India). *AmoA* gene, which encodes the catalytic  $\alpha$ -subunit of the ammonia monooxygenase enzyme involved in nitrification, has been successfully used to survey the diversity of both ammonia oxidizing bacteria (AOB) and Archaea (AOA) in mangroves (Li et al. 2011a). Elimination of N from sediments under gaseous forms (N<sub>2</sub>, NO, N<sub>2</sub>O) can be done through denitrification or anammox which both require anoxic conditions. Genes encoding nitrite reductase (*nirK* or *nirS*) and nitrous oxide reductase (*nosZ*), that are key enzymes for the process of denitrification, are good molecular markers to study denitrifying communities (Braker et al. 2000). Based on molecular diversity of the *hzo* gene encoding for hydrazine oxidoreductase or 16S rRNA, anammox bacteria have been detected in mangrove sediments (Li et al. 2011b, Wang et al. 2014a, Li and Gu 2013) but this process seems to contribute much less than denitrification to N-loss from the mangrove ecosystem (Fernandes et al. 2012, Amano et al. 2011).

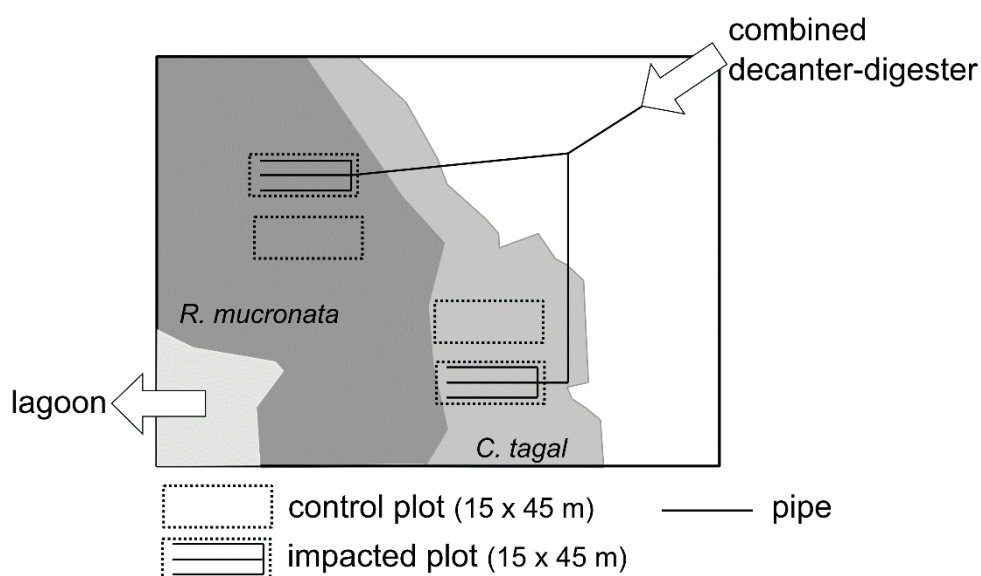
The structure and activity of functional microbial communities linked to N-cycling in mangroves are influenced by many environmental factors such as salinity (Tam 1998), depth, tree species (Wang et al. 2014b, 2015), nutrient concentration (Li and Gu 2013) or dissolved oxygen concentration (Luo et al. 2014). In a context of wastewater treatment by mangroves, the addition of sewage will certainly modify some of these conditions. This may have a strong impact on the structure of microbial communities and consequently on microbial activities, which are critical for the biopurification process. Several studies demonstrated the structure of microbial communities was influenced by diffuse pollution or anthropogenic influence in natural mangroves (Cao et al. 2011, Basak et al. 2015, Chakraborty et al. 2015, Fernandes et al. 2014), or by nutrients discharge (Li and Gu 2013) and wastewaters in microcosms (Tam 1998).

Since the potential of biopurification of mangrove soils notably relies on its microbial communities, it is crucial to understand what is the long-term impact of wastewaters on functional and whole communities, in interaction with the local environmental parameters. To our knowledge, this has not been done for natural mangroves in controlled conditions of wastewater discharge. This should help to better define biopurification conditions for natural mangroves, notably the best vegetation zone for discharge. To that end, we compared the structure and abundance of whole and functional microbial communities of mangrove plots and their relationship with environmental data in the large-scaled pilot experiment initially set-up by Herteman *et al.* (2011). The diversity, abundance and activity of denitrifying bacteria and ammonia-oxidizing bacteria and archaea have been assessed during the dry and the rainy seasons, along with the structure of whole micro-eukaryotes, bacteria and Archaea communities.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Study site**

The study site, set up in a mangrove area located in Chirongui Bay, South-West of Mayotte Island in the Indian Ocean (12°55'S, 45°09'E), was described by Herteman *et al.* (2011). Domestic wastewaters from Malamani village (100 inhabitants) are pretreated in a horizontal primary settlement tank with integrated sludge digester before being carried through a pipe network to the mangrove area. Wastewater was discharged during one low tide per day for 1 hr., with a volume of 10 m<sup>3</sup>, in two mangrove areas (45 m x 15 m) dominated by *Ceriops tagal* (Perr.) C.B. Robinson and *Rhizophora mucronata* Lam, respectively. Near these two areas, designated here after as 'impacted areas', two equivalent 'control areas' not subjected to wastewater disposal were used as references (Figure 1). The mangrove zone dominated by *R. mucronata* is closer to the lagoon than the one dominated by *C. tagal* and hence less subjected to tides. The average nutrient composition of pretreated domestic wastewater is given in Table 1. The study was performed in October 2012, at the end of the dry season, and in April 2013, at the end of the rainy season. The system of pretreated wastewater discharge is operational since April 2008, so that the impacted areas received wastewaters for 4.5 to 5 years.



**Figure 1.** Schematic representation of the study site, with the mangrove plots and the pipe network.

**Table 1.** Nutrient content of pretreated domestic wastewater (mean  $\pm$  SE, measures made on 2 consecutive days on 2 different points).

nutrient ( $\mu\text{M}$ )	Dry season	Rainy season
$\text{NO}_3^-$	$0.46 \pm 0.03$	$0.10 \pm 0.02$
$\text{NO}_2^-$	$0.64 \pm 0.25$	$0.29 \pm 0.06$
$\text{NH}_4^+$	$3834 \pm 134$	$965 \pm 49$
$\text{PO}_4^{3-}$	$186.2 \pm 0.12$	$50.8 \pm 4.65$

## 2.2. Experimental design and sampling

In order to study the growing microorganisms, we sampled the organisms that were able to colonize sterile substrates at the sediment surface, though this may induce a selection effect. Ten artificial substrates (polyethylene, 15 x 5 x 0.5 cm) were placed vertically (to avoid sediment accumulation) close to the surface of sediments, parallel to the tide flow, on each of the 4 mangrove areas. They were maintained in open plastic crates. Some substrates were removed after 3, 6, 9 and 12 days of biofilm growth and transported carefully to the field laboratory in a cool-box. Biofilms from 4 (at day 3) or 2 (at the other sampling dates) substrates were scrapped using a sterile scalpel and pooled in 10 mL of filtration-sterilized seawater. A

homogenized subsample was filtered (polycarbonate, 0.22  $\mu\text{m}$ ) until clogging for later DNA extraction. The filter was then stored in absolute ethanol at 4°C. Another subsample was filtered until clogging on a weighted filter (0.22  $\mu\text{m}$ ) before drying at 60°C for the determination of dry matter. The exact filtered volumes were noted.

The light intensity on each plot was determined with a flat quantum sensor (model LI-189, LICOR, Inc, Lincoln, Nebraska).

On each area, 5 nets (1 m x 1 m) were randomly positioned in order to collect leaves, flowers, and fruits from mangrove trees. The content of the nets was sampled every two weeks and weighted after desiccation in an air oven.

On each area, 4 plots (1 m x 1 m) were delimited and the total number of crab holes inside were counted. The same plots were used for the 2 sampling periods.

The salinity and temperature of water on surface sediment were measured directly in the field in residual pools at low tide and samples were taken and stored at 4°C for later determination of nutrient ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{PO}_4^{3-}$ ) concentrations. Analyses were performed by the ARVAM Laboratory (La Réunion, France) using classic colorimetric methods according to standard methods (APHA et al. 1992). Mean values were obtained from two-day measurements under similar hydrological conditions, in the upper and lower parts of the areas (total of 4 measures).

These parameters have been chosen because vegetation, crabs and interstitial water are 3 major compartments in mangrove ecosystems.

### 2.3.DNA extraction

DNA extraction was performed with the “PowerSoil DNA Isolation” kit (MoBio, Carlsbad, California) according to manufacturer’s instructions. Before DNA extraction, the filters of biofilm samples (stored in ethanol) were rinsed and dried with speed vacuum before application of the extraction buffer. The quality of total DNA was checked using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermofisher Scientific, Carlsbad, California) and by gel electrophoresis (agarose, 1 % in TAE 0.5X).

### 2.4.Characterization of micro-eukaryotes and bacteria community structure by ARISA

The genetic diversity of micro-eukaryotes and bacteria whole communities was determined with Automated Ribosomal Intergenic Analysis (ARISA) after Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification of the intergenic spacer between genes coding for 18S and 28S rRNA, and 16S and 23S rRNA, respectively.

The primers used (Supplementary Material, Table 1) have been designed to amplify a large range of micro-eukaryotes and bacteria. A 5FAM (CarboxyFluorescein-Aminohexyl Amidite)-labelled primer was used in each PCR reaction. PCR were performed in 20  $\mu$ L of reaction volume containing 20 ng of DNA template, 0.5 U of GoTaq Flexi DNA polymerase ((Promega, Charbonnières-les-Bains, France), 1x PCR GoTaq Flexi buffer, 0.5  $\mu$ M of each primer, 0.8 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.5 mg/mL bovine serum albumin (BSA) and 2.5 mM  $MgCl_2$  for micro-eukaryotes and 2 mM  $MgCl_2$  for bacteria. PCR conditions, followed by a final 5 min elongation step at 72°C, are given in Supplementary Material, Table 1

After denaturation (3 min at 96°C in presence of formamide), the PCR products were run on 3130 xl Capillary Genetic Analyzer (Applied Biosystems) together with the DNA size standard ladder LIZ1200 (Applied Biosystems, Foster City, California) and were analyzed with the Peak Scanner 1.0 software (Applied Biosystems). The size of DNA fragments was rounded to the nearest whole number. Peaks that differed from less than 2 bp were considered to correspond to the same Operational Taxonomic Unit (OTU). Fragments of less than 200 bp were excluded from the analysis since intergenic spacer is always higher than 200 bp. The area under the peaks was normalized to the total area of the sample and peaks corresponding to less than 1 % of total area were excluded from the analysis. Peaks on the chromatogram, corresponding to OTUs, were scored as present or absent from the chromatogram analysis and gathered in a taxa (OTU)-presence matrix.

## 2.5.Characterization of community structure by DGGE

The genetic diversity of Archaea, denitrifying bacteria, AOA and AOB was determined with PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). All DGGE experiments were performed with a D-Code Universal Mutation Detection System (BioRad, Hercules, California) as described by Muyzer et al. (1997). The vertical gradients of denaturant were 0-70%, 30-70%, 20-80 % or 30-80 % (where 100 % denaturant corresponds to 7 M urea and 40 % deionized formamide). A quantity of 500 ng of DNA was used for each sample. DGGE was run for 18 h at 100 V and at 60°C. After electrophoresis, the gels were stained with SYBR Green I (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, dilution 1 : 5000) and visualized using UV transillumination. An image was captured using a CCD camera and the BIOCAPT software (Vilber Lourmat, Collégien, France). DGGE bands, corresponding to OTUs, were scored as present or absent from the gel analysis.

Because of constraints linked to the size of DGGE gel and the low reliability of gel comparisons, only the samples of the same season were run on the same gel and compared.

### 2.5.1. *Archaea community structure*

Nested PCR was used for the analysis of archaeal diversity, as described by Pires et al. (2012). A first PCR was performed with Archaea specific primers to amplify the V4 and V5 regions of the 16S rRNA gene (Supplementary Material, Table 1), in 20  $\mu$ L reaction volume, with 8 ng of DNA template, 2 U of GoTaq Flexi polymerase (Promega), 1x PCR GoTaq Flexi buffer, 0.2  $\mu$ M of each primer, 0.8 mM dNTP, 0.1 mg/mL BSA, 2.75 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 % (v/v) formamide. To obtain suitable fragments for DGGE, a second PCR was done, in 50  $\mu$ L of reaction volume, with 2  $\mu$ L of the first PCR product, 2 U of GoTaq Flexi polymerase (Promega), 1x GoTaq Flexi buffer, 0.2  $\mu$ M of each primer, 0.8 mM dNTP, 0.1 mg/mL BSA and 2.75 mM MgCl<sub>2</sub>. For both amplifications, PCR conditions, followed by a final 5 min elongation step at 72°C, are given in Supplementary Material, Table 1. DGGE was then performed as described above, with a vertical gradient of denaturant of 20-80 %.

### 2.5.2. *Denitrifier community structure*

Denitrifier community structure was assessed through the diversity of nitrite reductase gene *nirK* and nitrous oxide reductase gene *nosZ* as described by Clark et al. (2012). PCR were performed in 50  $\mu$ L of reaction volume, with 50 ng of DNA template, 1.25 U of GoTaq Flexi polymerase (Promega), 1x GoTaq Flexi buffer, 0.2  $\mu$ M of each primer (Supplementary Material, Table 1), 0.8 mM dNTP, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.025 mg/mL BSA for *nirK* only and 3 % (v/v) DMSO for *nosZ* only. For both amplifications, PCR conditions, followed by a final 5 min elongation step at 72°C, are given in Supplementary Material, Table 1. DGGE was performed as described above, with a vertical gradient of denaturant of 20-80 % and 30-80 %, respectively for *nirK* and *nosZ*.

### 2.5.3. *AOB community structure*

For the amplification of a fragment of the 16S rRNA gene specific for the AOB of the  $\alpha$ -proteobacteria division, a nested PCR was used as described by Dias et al. (2012). For the first reaction, a mixture of 3 different forward primers (Supplementary Material, Table 1) was used (Kowalchuk et al. 1997). PCR was performed in 20  $\mu$ L of reaction volume, with 20 ng of DNA template, 0.5 U of GoTaq Flexi polymerase (Promega), 1x GoTaq Flexi buffer, 0.3  $\mu$ M of each primer, 0.8 mM dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.4 mg/mL BSA. To obtain suitable fragments for DGGE, a second PCR was performed with non-specific bacterial primers (Supplementary Material, Table 1) (Muyzer et al. 1993), in 50  $\mu$ L with 0.5  $\mu$ L of the first PCR product and 1.25 U of GoTaq Flexi polymerase, under the same conditions than the first PCR. PCR conditions,

followed by a final 5 min (1st PCR) or 30 min (2nd PCR) elongation step at 72°C, are given in Table 2. DGGE was then performed as described above, with a vertical gradient of denaturant of 30-70 %.

#### 2.5.4. AOA community structure

AOA community structure was studied with a PCR-amplification of a fragment of the Crenarchaeal *amoA* gene, as described in Tourna et al. (2008). PCR was performed in 50 µL of reaction volume, with 25 ng of DNA template, 1.25 U of GoTaq Flexi polymerase (Promega), 1x GoTaq Flexi buffer, 0.5 µM of each primer, 0.8 mM dNTP, and 0.5 mg/mL BSA. DGGE was performed as described above, with a vertical gradient of denaturant of 0-70 %.

#### 2.6. Estimation of bacterial density by quantitative PCR

The total density of bacteria, as an indicator of biofilm growth, and the density of bacteria involved in functional processes were determined at days 6, 9 and 12 for each season. Quantitative PCRs (qPCR) targeting the bacterial 16S rRNA gene and the functional genes of denitrification (*nosZ* clade I), and nitrification (*amoA*) were performed in triplicate for each DNA extract. The quantification was based on the fluorescence intensity of the SYBR green dye, which binds to double-stranded DNA.

For the 16S rRNA gene, standard curves were obtained using serial dilution of DNA extracted from an *Escherichia coli* culture. The *nosZ* clade I and *amoA* genes standards were amplified from environmental samples in a total volume of 25 µL, containing 25 (*nosZ* clade I) or 10 (*amoA*) ng of DNA template, 1 U of GoTaq® G2 Flexi DNA polymerase (Promega), 1X GoTaq® G2 Flexi buffer, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.8 mM dNTP, 1 µM of each primer and 0.3 (*nosZ* clade I) or 0.2 (*amoA*) mg/mL of BSA. Thermal cycling conditions and primers used for each reaction are described in Supplementary Material, Table 1. Every PCR started with an initial step at 95°C for 10 min and finished by a final step at 72°C for 3 min. PCR fragments (259 bp for *nosZ* clade I, 491 bp for bacterial *amoA*, 635 bp for archaeal *amoA*) were next cloned into a pGEMT plasmid using the pGEM®-T Easy Vector System II (Promega) according to the manufacturer's recommendations. Plasmids extractions were carried out with the NucleoSpin® Pasmid kit (Macherey-Nagel, Hoerdtt, France) following the manufacturer's instructions. Recombined plasmids were linearized with the *EcoRI* restriction enzyme (Promega). Standard curves were obtained using serial dilution of linearized plasmids containing between 10<sup>7</sup> and 10<sup>1</sup> gene copies/µL.



The quantitative PCR analyses of biofilm samples were carried out in a final volume of 20  $\mu$ L containing 1X of Takyon™ Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue (Eurogentec, Liege, Belgium), 0.3 mg/mL of BSA (Promega), 5  $\mu$ L of DNA samples or standards, and 0.3  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, and 0.2  $\mu$ M of each primers (Invitrogen, Carlsbad, California) for 16S rRNA, *nosZ* clade I, and *amoA* genes respectively (Supplementary Material, Table 1). Quantitative PCRs were carried out on the StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) starting by an initial enzyme activation at 95°C for 3 min for each PCR. The thermal cycling conditions used for qPCR of each gene are described in Supplementary Material, Table 1. Serial dilutions of the DNA extracted from biofilm samples were quantified and compared to check the presence of PCR inhibitors but no inhibition was detected. Melting curves were analyzed using StepOne™ v2.3 software to confirm the specificity and efficiency of the amplification and the quantifications of gene in samples were deduced from standard curve.

In order to compare the responses of the functional communities independently from effects on microbial growth, the gene densities obtained with qPCR were divided by the mean number of 16S gene copies on each corresponding mangrove plot.

## 2.7. Estimations of potential and *in situ* denitrification activity

In order to have an insight in the impact of mangrove zone on *in situ* and potential denitrification activity, some measurements have been made directly on sediments in April 2013. We have chosen to work on sediments rather than on biofilms because after 12 days of incubation, the biomass seemed too low to obtain reliable measures.

*Potential denitrification enzyme activity* (DEA) was measured on 10 cm-depth sediments sampled on each mangrove plot, beside the crates containing the artificial substrates, with a 50 mL-truncated syringe. These samples were stored at 4°C until the experimentation was performed, a few days later in metropolitan France. It has been shown that keeping samples at 4°C up to 10 days does not modify their denitrifying activity (Breitenbeck and Bremner 1987). For each sample, 2 flasks (150 mL) received approximately 10 mL of sediments and were pre-incubated at 30°C during 24 hrs to re-activate bacteria. Fifty mL of incubation medium (deoxygenated demineralized water containing N-NO<sub>3</sub> (100 mg/L) and organic C (50 mg/L), at a salinity of 30 psu) were added to each flask. Then the flasks were sealed with rubber stoppers and deoxygenized by diffusion of N<sub>2</sub> during 20 min. After 40 min of incubation, 15 mL of incubation medium saturated with acetylene were added in one flask of each sample, the other one receiving medium without acetylene (negative control). The acetylene blocks the last step

of denitrification (formation of  $N_2$  from  $N_2O$ ), allowing the accumulation of  $N_2O$  in the flasks (Sorensen 1978). The flasks were incubated in the dark at 30°C with agitation. After 6 and 24 hrs of incubation, 6 mL of gas were sampled and immediately analyzed for  $N_2O$  concentration on a gas chromatograph (VARIAN 3800) equipped with a  $^{63}Ni$  capture detector. The carrier gas was a mixture of argon / methane (90%-10%). The separation was made on a Porapak Q column at 80°C, the injector and detector temperatures were 120°C and 280°C, respectively. After the incubations, the ash-free dry mass (AFDM) of each sediment sample was determined after combustion (550°C, 8 hrs). The  $N_2O$  quantified in the flasks without acetylene was produced by the activity of denitrifying bacteria lacking the gene *nosZ*, like those having the genes *nirS* or *nirK*, while the  $N_2O$  in the flasks with acetylene was produced by all the denitrifying bacteria (Philippot et al. 2011). The ratio of  $N_2O$  quantities in flasks without / with acetylene is an indication of the importance of *nirS/nirK* bacteria compared to *nosZ* bacteria.

*In situ denitrification rates* were measured in the field using airtight chambers (diameter 10 cm, height 15 cm) inserted at the sediment surface during low tide to measure the quantity of  $N_2O$  produced in the presence of acetylene. The incubation chambers allowed direct gas sampling with a gastight syringe through a septum. On each mangrove plot, 4 chambers were used, 2 on sediments that received acetylene via the *in situ* reaction of calcium carbide with water and 2 on sediments that received no acetylene (negative control). Six mL of gas were sampled after 30, 60 and 120 min of incubation and stored in the dark in pre-evacuated Venoject tubes (Terumo, Tokyo, Japan).  $N_2O$  concentration in gas samples was determined as for potential DEA, within a few days after sampling.

## 2.8. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using the free PAST software ((Delarue et al. 2015) Paleontological Statistics, v2.17, <http://folk.uio.no/ohammer/past/>). In order to test the effects of mangrove zone and wastewater supply (WS) or season, the matrixes of environmental, ARISA and DGGE data were analyzed with non-parametric multivariate analyses of variance (2-ways NP-MANOVAs and 1-way NP-MANOVA followed by post-hoc tests). Two-ways analyses of variances (ANOVAs) were used to test the effects of mangrove zone and WS on univariate data (each environmental parameter, dry matter, number of gene copies, ratios of gene copies, number of OTU, potential and *in situ* DEA). Statistical differences in each mangrove plot or between seasons were inferred with one-way ANOVAs followed by post-hoc tests (Fisher). When necessary, the data were transformed to meet ANOVA assumptions. If not

possible, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used with Mann-Whitney tests for pairwise comparisons. For each mangrove area, the qPCR data from the 3 dates and the 2 seasons (6 measures) were used to test the effects of WS. For correlation tests, Pearson test was used when variables were normally distributed, and Spearman test otherwise. For all statistical analyses, significance was inferred at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Effects of wastewater supply on environmental parameters

In order to determine the environmental differences between the mangrove areas, the tree productivity, crab holes density and the physico-chemistry of residual water have been measured during the rainy and dry seasons (Table 2). NP-MANOVAs followed by post-hoc tests performed on all the collected data for each season indicate that the 4 mangrove areas were significantly different from each other except for the control and impacted areas of *C. Tagal* zone during the dry season ( $p = 0.0001$  for NP-MANOVAs, see Supplementary Material, Table 2 for post-hoc p-values).

The results of two-way ANOVA followed by post-hoc tests performed on these data indicate how the 2 mangrove zones initially differed (column “control vs. control” in Table 3). During the rainy season, the main differences were a lower salinity and higher concentrations of  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  and crab holes density in the *Rhizophora mucronata* zone. During the dry season, the mangrove zones differed mainly by the incident light, the temperature, and the salinity (tendency) which were higher in the *Ceriops tagal* plot, while the  $\text{NH}_4^+$  concentration was 10-times higher in the *R. mucronata* plot (Table 2, Table 3).

**Table 2.** Environmental parameters measured on the mangrove plots (mean  $\pm$  SE, n = 4). The measures of light cannot be compared between seasons because of weather influence.

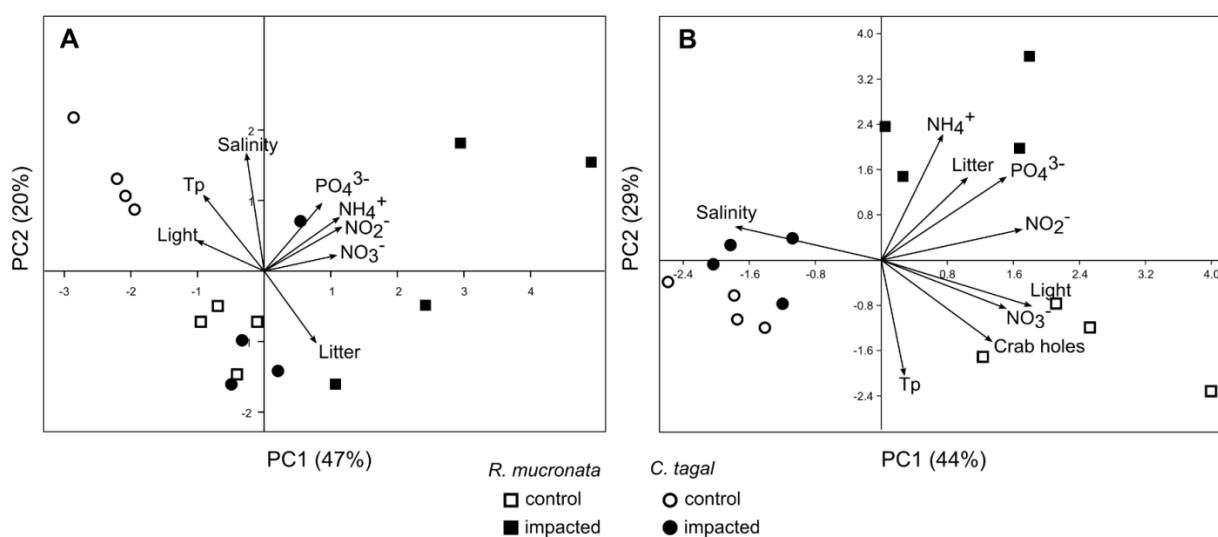
Parameter	season	<i>R. mucronata</i> control	<i>R. mucronata</i> impacted	<i>C. tagal</i> control	<i>C. tagal</i> impacted
Light ( $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	<i>dry</i>	33	7	90	72
	<i>rainy</i>	1487	556	214	46
Salinity (psu)	<i>dry</i>	34.7 $\pm$ 1.4	34.8 $\pm$ 1.8	39 $\pm$ 0.4	33.7 $\pm$ 1.4
	<i>rainy</i>	27.1 $\pm$ 1.8	30 $\pm$ 0.6	31.7 $\pm$ 0.2	32.8 $\pm$ 0.4
Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	<i>dry</i>	26 $\pm$ 0.3	25.3 $\pm$ 0.2	31.3 $\pm$ 1.3	26.1 $\pm$ 0.6
	<i>rainy</i>	29.0 $\pm$ 0.3	27.3 $\pm$ 0.1	28.8 $\pm$ 0.1	27.5 $\pm$ 0.1
$\text{NO}_3^-$ ( $\mu\text{M}$ )	<i>dry</i>	0.16 $\pm$ 0.08	0.77 $\pm$ 0.27	0.05 $\pm$ 0.05	0.53 $\pm$ 0.15
	<i>rainy</i>	0.54 $\pm$ 0.08	0.32 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.08	0.39 $\pm$ 0.04
$\text{NO}_2^-$ ( $\mu\text{M}$ )	<i>dry</i>	0.17 $\pm$ 0.02	0.94 $\pm$ 0.32	0.1 $\pm$ 0.01	0.33 $\pm$ 0.12
	<i>rainy</i>	0.22 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.08	0.03 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.02
$\text{NH}_4^+$ ( $\mu\text{M}$ )	<i>dry</i>	1.32 $\pm$ 0.38	78.10 $\pm$ 24.76	0.11 $\pm$ 0.01	28.29 $\pm$ 15.50
	<i>rainy</i>	3.56 $\pm$ 0.77	22.19 $\pm$ 5.72	1.57 $\pm$ 0.51	2.47 $\pm$ 0.4
$\text{PO}_4^{3-}$ ( $\mu\text{M}$ )	<i>dry</i>	0.50 $\pm$ 0.10	3.33 $\pm$ 0.94	0.89 $\pm$ 0.14	0.09 $\pm$ 0.01
	<i>rainy</i>	1.64 $\pm$ 0.15	2.58 $\pm$ 0.4	0.46 $\pm$ 0.06	0.12 $\pm$ 0.03
Crab hole density ( $\text{m}^{-2}$ )	<i>dry</i>	64.3 $\pm$ 8.6	20.8 $\pm$ 4.0	25.8 $\pm$ 7.8	31.5 $\pm$ 15.7
	<i>rainy</i>	53.25 $\pm$ 7.6	15.25 $\pm$ 0.75	15.75 $\pm$ 1.9	23.25 $\pm$ 10.5
Litter ( $\text{g.m}^{-2}.\text{day}^{-1}$ )	<i>dry</i>	1.96 $\pm$ 0.37	2.87 $\pm$ 0.45	0.68 $\pm$ 0.07	2.62 $\pm$ 0.74
	<i>rainy</i>	1.88 $\pm$ 0.53	2.64 $\pm$ 0.31	0.62 $\pm$ 0.11	1.48 $\pm$ 0.49

**Table 3.** Results of ANOVAs and Kruskal-Wallis tests (when normality is not respected) performed on environmental parameters measured on the mangrove plots. The test ‘control vs control’ (‘imp vs imp’) compares the control (impacted) plots of the *C. tagal* and *R. mucronata* zones. (Mang. zone = mangrove zone, WS = wastewater supply). Significant p-values are in bold.

	1-way ANOVA	2-way ANOVA				Kruskal-Wallis	Post-hoc Control vs. Impacted		Control vs Control	Imp vs Imp
	Season	Season	Mang. zone	WS	Mang. zone*WS		<i>C. tagal</i>	<i>R. mucronata</i>		
Light	-	<i>dry</i>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.32		<b>0.032</b>	<b>0.002</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>
		<i>rainy</i>	-	-	-		-	-	-	-
Salinity	<b>&lt;0.0001</b>	<i>dry</i>	0.33	0.11	0.10		-	-	-	-
		<i>rainy</i>	<b>0.006</b>	0.092	0.45		0.87	0.30	0.058	0.32
Temperature	0.20	<i>dry</i>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.009</b>		<b>0.001</b>	0.89	<b>0.001</b>	0.83
		<i>rainy</i>				<b>0.008</b>	<b>0.030</b>	<b>0.028</b>	1	0.30
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.37	<i>dry</i>	0.31	<b>0.004</b>	0.7		0.18	0.07	0.96	0.74
		<i>rainy</i>	<b>0.06</b>	0.72	<b>0.008</b>		0.24	0.11	<b>0.01</b>	0.86
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	<b>0.046</b>	<i>dry</i>	0.071	<b>0.013</b>	0.14		0.78	<b>0.035</b>	0.99	0.10
		<i>rainy</i>	<b>0.001</b>	0.68	0.64		0.92	1	<b>0.033</b>	0.10
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.079	<i>dry</i>				<b>0.004</b>	<b>0.030</b>	<b>0.030</b>	<b>0.030</b>	0.31
		<i>rainy</i>	<b>0.002</b>	<b>0.005</b>	<b>0.010</b>		0.99	<b>0.003</b>	0.96	<b>0.002</b>
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.79	<i>dry</i>	<b>0.0004</b>	0.063	<b>&lt;0.0001</b>		<b>0.025</b>	<b>0.0003</b>	0.50	<b>0.0002</b>
		<i>rainy</i>	<b>&lt;0.0001</b>	0.84	<b>0.001</b>		0.056	<b>0.035</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.0001</b>
Crab hole density	0.28	<i>dry</i>	0.18	0.081	<b>0.029</b>		0.97	<b>0.040</b>	0.073	0.86
		<i>rainy</i>	<b>0.044</b>	<b>0.038</b>	<b>0.004</b>		0.85	<b>0.007</b>	<b>0.007</b>	0.82
Litter	0.35	<i>dry</i>	0.13	<b>0.010</b>	0.29		0.056	0.54	0.27	0.98
		<i>rainy</i>	<b>0.01</b>	0.065	0.9		0.45	0.55	0.16	0.22

The WS lowered the differences between the mangrove zones for most of the measured parameters, except for the concentrations of  $\text{PO}_4^{3-}$  during both seasons, and  $\text{NH}_4^+$  during the rainy season, for which the difference increased (column “impacted vs. impacted” in Table 3). Overall, the WS induced a significant decrease of the incident light and the temperature and an increase in  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations, during the dry season, in both mangrove zones. The effect of WS varied according to the mangrove zone, as indicated by significant mangrove zone x treatment interactions. This effect was more marked in the *R. mucronata* area, in terms of nutrient concentrations.

All these results are illustrated by PCAs performed on all the data collected for each season (Figure 2). This analysis suggests that the effects of WS were more important during the dry season and on *R. mucronata* area. These effects were more related to light, temperature and salinity for *C. tagal* areas, and to nutrient concentrations for *R. mucronata* areas.

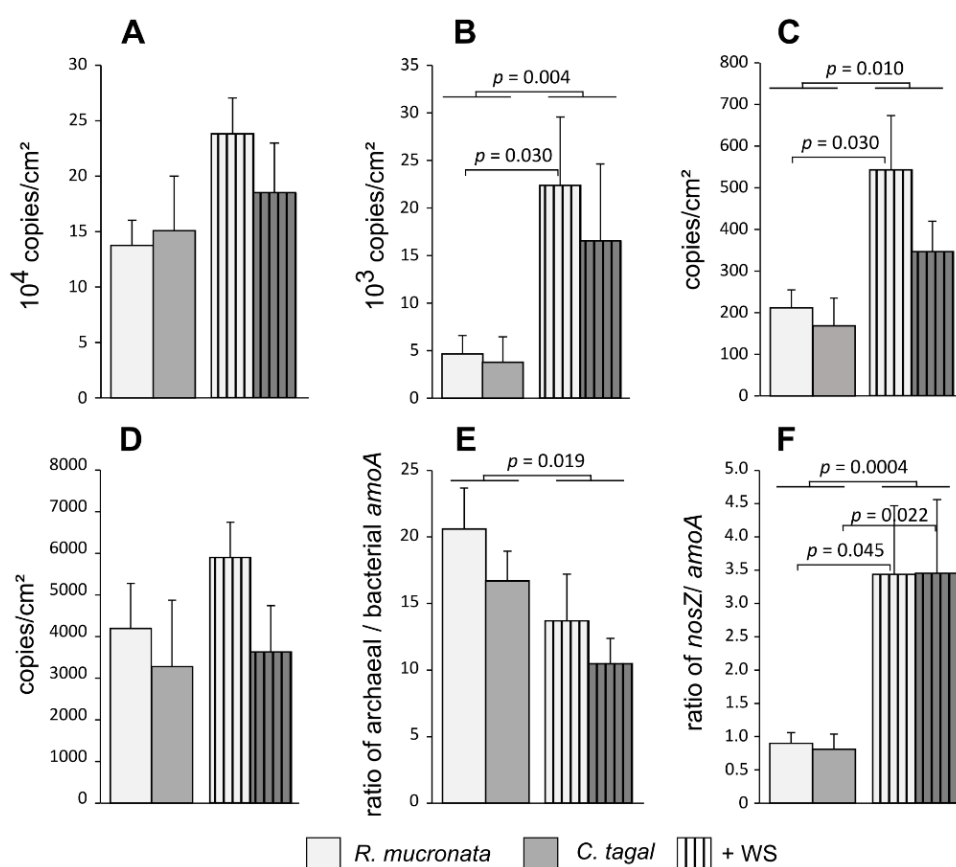


**Figure 2.** Results of principal component analysis of the environmental parameters in the mangrove plots, during the dry (A) and the rainy (B) seasons. The data were collected in *R. mucronata* (squares) or *C. tagal* (circles) zones, in control (open symbols) or impacted (closed symbols) plots. Arrows represent variables (very small arrows are not represented), Tp = temperature.

### 3.2. Effects on microbial densities

The development of biofilms on the artificial substrates was assessed by measuring the dry matter. This dry matter was almost stable between the sampling dates. The mean dry matter of

all the sampling dates was higher during the dry season than during the rainy season ( $14.0 \pm 1.6 \text{ g/m}^2$  and  $5.2 \pm 0.9 \text{ g/m}^2$ , respectively). The values reached were not significantly different between the mangrove areas (ANOVA,  $p = 0.99$  and  $0.36$  in dry and rainy season, respectively). Quantitative PCR results indicated that the bacterial density was rather stable between 6 and 12 days of incubation for each season when considering the samples from all the areas together (one-way ANOVA,  $p = 0.07$  and  $0.06$  for dry and rainy seasons, respectively). WS induced no significant effect in bacterial density (one-way ANOVA,  $p = 0.29$ ), though it tended to increase on impacted *R. mucronata* area (Figure 3A).



**Figure 3.** Mean number of gene copies detected on the artificial substrates: 16S (A), *nosZ* (B), bacterial *amoA* (C), archaeal *amoA* (D) and ratios between the numbers of copy of archaeal and bacterial *amoA* (E) and between *nosZ* and *amoA* genes copies (F). Vertical bars represent standard error (n = 3 sampling dates). The given  $p$ -values correspond to Mann-Whitney tests. WS = wastewater supply.

The densities of nitrifying and denitrifying communities have been estimated with qPCR performed on bacterial and archaeal *amoA* and *nosZ* clade I genes. No consistent pattern was observed between data from 6, 9 or 12 days of incubation so that these data were grouped for

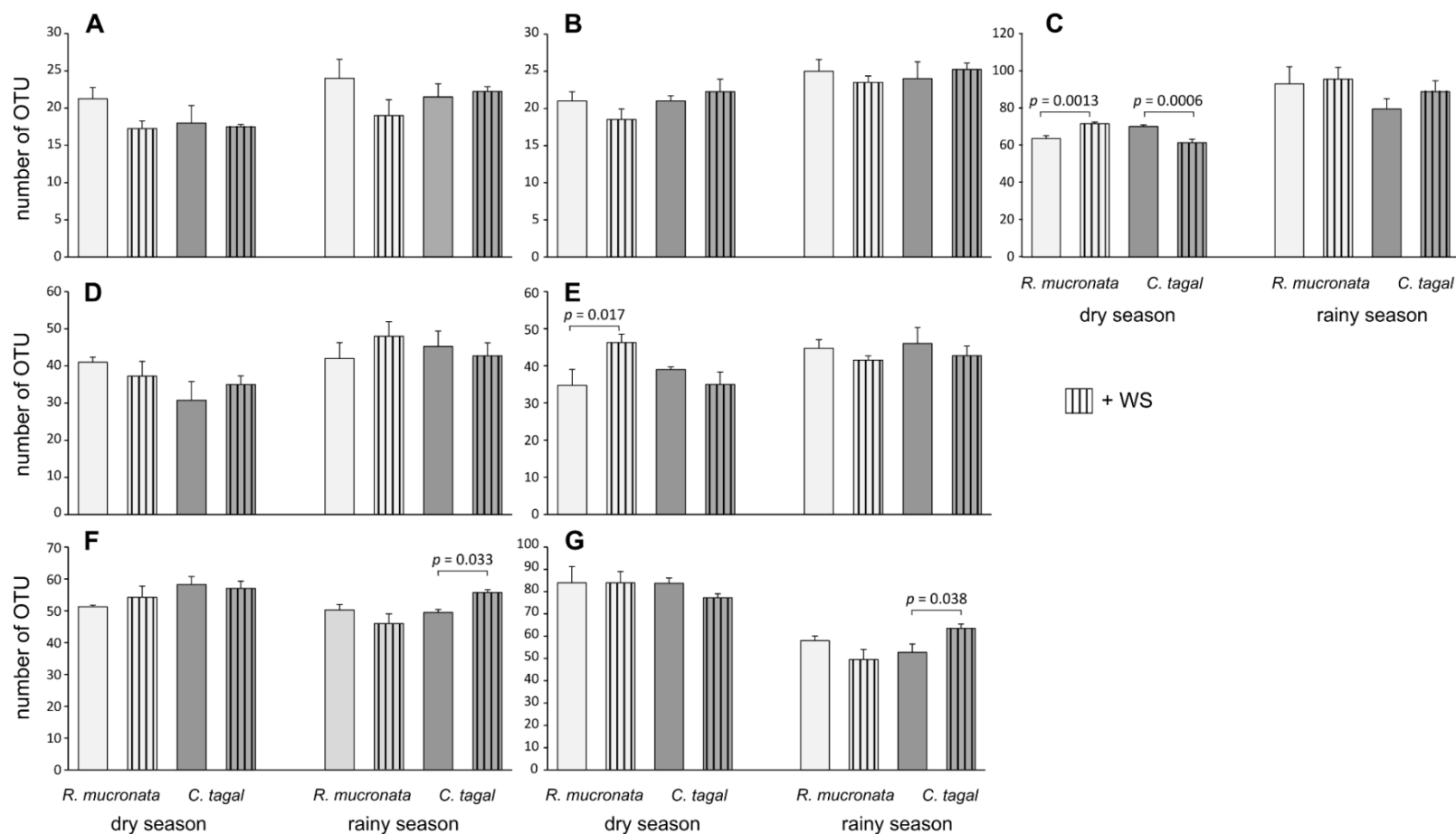
the statistical analyses. The mean number of archaeal *amoA* copies per cm<sup>2</sup> was more than ten times higher than the one of bacterial *amoA* (4 293 and 323 copies/cm<sup>2</sup>, respectively) and lower than the one of *nosZ* (11 816 copies/cm<sup>2</sup>). No significant effects of the season or the mangrove zone on the numbers of copies of any of the genes were observed. In contrast, WS significantly increased the number of copies of *nosZ* clade 1 (Figure 3B) and the number of copies of bacterial *amoA* (Figure 3C), notably in the *R. mucronata* impacted area. No effect was observed for the archaeal *amoA* (Figure 3D). The ratio AOA/AOB decreased with WS (Figure 3E) while the ratio *nosZ* / *amoA* significantly increased on both impacted areas (Figure 3F).

The numbers of *amoA* and *nosZ* genes copies were not correlated with the number of 16S gene copies but were significantly correlated with each other ( $0.61 < r < 0.65$ ,  $p$  values  $< 0.005$ ). The salinity was positively correlated with the number of archeal *amoA* ( $r = 0.70$ ,  $p = 0.050$ ) copies avec with the ratios bacterial *amoA* / 16S ( $r = 0.77$ ,  $p = 0.024$ ) and *nosZ* / 16S ( $r = 0.72$ ,  $p = 0.042$ ). The ratio AOA/AOB is negatively correlated with the temperature ( $r = -0.70$ ,  $p = 0.049$ ) and positively with NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ( $r = 0.74$ ,  $p = 0.041$ ).

### 3.3. Response of microbial diversity

The  $\alpha$ -diversity of the studied microbial groups was estimated by the number of OTUs detected by PCR-DGGE or ARISA fingerprinting methods (Figure 4, Supplementary Material Table 3). The use of different methods and the variability between gel electrophoreses did not allow comparisons between the microbial groups. Two-way ANOVAs indicated that the diversity was only poorly affected by the mangrove zone or the WS (Supplementary Material Table 3, Figure 4). Post-hoc tests indicate that during the dry season the WS induced a significant decrease of the observed diversity of Archaea in *C. tagal* area, while in contrast it increased in *R. mucronata* area (Figure 4C), along with a 33 %-increase in denitrifying bacteria (*nosZ*) diversity (Figure 4E). During the rainy season, the diversity of AOA and AOB significantly increased by 20 and 12 %, respectively, in *C. tagal* impacted areas (Figure 4F, G).





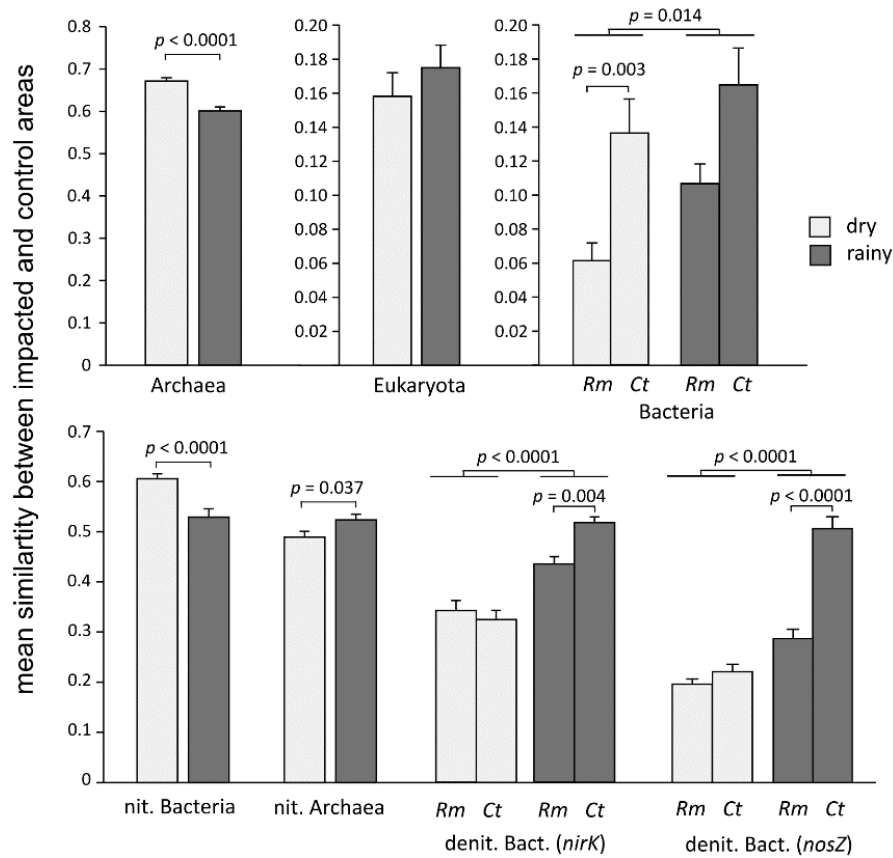
**Figure 4.** Number of OTU detected on the artificial substrates, in the different communities: Eukaryota (A), Bacteria (B), Archaea (C), denitrifying bacteria (nirK) (D), denitrifying bacteria (nosZ) (E), nitrifying bacteria (F) and nitrifying archaea (G). Vertical bars represent standard error (n=4). The given *p*-values correspond to Fisher post-hoc test.

There was a positive correlation between the  $\alpha$ -diversity of Bacteria and micro-eukaryotes ( $r = 0.74, p = 0.034$ ). The number of OTU of AOA was positively correlated to those of AOB ( $r = 0.71, p = 0.046$ ) but negatively to those of Bacteria ( $r = -0.80, p = 0.015$ ) and Archaea ( $r = -0.84, p = 0.008$ ). The  $\alpha$ -diversity of *nirK* gene was negatively correlated to the one of AOB ( $r = -0.87, p = 0.011$ ) and AOA ( $r = -0.82, p = 0.004$ ). No correlation was found between the level of diversity of *nirK* and *nosZ* genes.

The salinity was positively correlated to the number of OTU of AOA ( $r = 0.8, p = 0.018$ ) and AOB ( $r = 0.71, p = 0.04$ ), and negatively to the number of OTU of Archaea ( $r = -0.72, p = 0.04$ ) and denitrifying bacteria (*nirK*) ( $r = -0.75, p = 0.03$ ). The diversity of AOA was also negatively correlated with light ( $r = -0.83, p = 0.017$ ). No correlation was found between the numbers of OTU and the numbers of genes copies assessed with qPCR.

The presence-absence matrixes derived from PCR-DGGE and ARISA results were analyzed with two-way NP-MANOVAs and one-way NP-MANOVA followed by post-hoc tests (Supplementary Material Table 4). These analyses highlighted the fact that the structures of all the microbial communities studied were strongly impacted by the season (tested only for the ARISAs), the mangrove zone and the WS. The effects of WS according to the season or the mangrove zone were assessed by comparing the mean similarity between impacted and control areas calculated with the Jaccard index (Figure 5). Except for the Eukaryota, the season significantly modified the effects of WS, the latter being either higher (lower similarity) during the rainy season (Archaea, AOB) or the dry season (AOA, denitrifying bacteria). In most cases the effects of WS were equivalent on the 2 mangrove zones, but for bacteria and denitrifying bacteria these effects were stronger on *R. mucronata* areas than on *C. tagal* areas (Figure 5).

In order to determine which environmental parameters influenced the structure of each microbial community, redundancy analyses have been performed. The light appeared to be the parameter with the strongest influence. The light measures were made within an hour for the control and impacted plots of the same mangrove zone, but they are hard to compare between mangrove zones and depended strongly on meteorological conditions. The RDA was therefore re-run without this parameter (Table 4). The environmental parameters that had the strongest influence on all the communities were the temperature and the phosphate concentration (rainy season). Contrasted results were observed between the 2 seasons, notably for Eukaryota and Archaea. The factors influencing AOA and AOB communities were similar (temperature and phosphate) while they were quite different for *nirK* or *nosZ* denitrifying bacteria. None of the considered parameters had a significant effect on the structure of bacterial communities.



**Figure 5.** Mean similarities of paris comparisons between impacted and control areas based on the composition of whole and functional communities assessed either with ARISA or DGGE, during the dry and rainy seasons. Vertical bars represent standard error (n=16 or 32). The given *p*-values correspond to post-hoc tests. *Rm*: *R. mucronata* area, *Ct*: *C. tagal* area, nit:nitrifying, denit: denitrifying.

**Table 4.** Environmental variables that explain significantly the OTU distribution in the different communities studied in RDA analyses and the corresponding % of explained variance. Significance was tested with a Monte-Carlo permutation test (\*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ ). Denit. bact. = denitrifying bacteria.

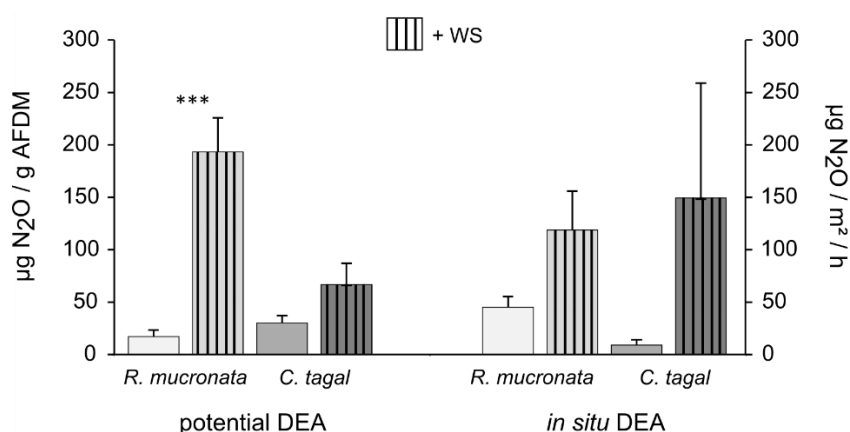
	<b>Eukaryota</b>		<b>Bacteria</b>		<b>Archaea</b>		<b>Denit.</b>	<b>bact.</b>	<b>Denit.</b>	<b>bact.</b>	<b>AOB</b>		<b>AOA</b>	
	<i>dry</i>	<i>rainy</i>	<i>dry</i>	<i>rainy</i>	<i>dry</i>	<i>rainy</i>	<i>nirK</i>		<i>nosZ</i>		<i>dry</i>	<i>rainy</i>	<i>dry</i>	<i>rainy</i>
Salinity	-	-	-	-	-	-	-	13**	-	-	-	-	-	-
Temperature	12**	-	-	-	17**	13**	9**	8*	-	-	12*	7*	14**	8*
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	-	17**	9*	-	9**	-	-	-	-
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	8*	12**	-	-	-	-	-	-	-
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	15**	19**	-	-	-	-
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	-	9*	-	-	9*	-	-	18**	-	20**	-	14*	10*	18**
crab														
hole														
density	-	10*	-	-	9*	-	18**		-	-	10*	10*	-	12**
litter	-	-	-	-	-	15**	-	-	21*	-	-	-	-	-

### 3.3. Microbial activity: denitrification

The denitrification activity of microbial communities from sediments close to the artificial substrates was studied during the rainy season. The potential DEA appeared to be strongly influenced by WS and by the mangrove zone (Table 5). In control areas, the DEA was similar in *C. tagal* and *R. mucronata* zones (Figure 6).

**Table 5.** Results of 2-way ANOVAs performed on potential and *in situ* DEA data. Mang. zone = mangrove zone, WS = wastewater supply. (\*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ ).

	Mang. zone	WS	Mang. zone*WS
potential DEA	<b>0.0114*</b>	<b>0.00001***</b>	<b>0.003**</b>
<i>in situ</i> DEA	<b>0.013*</b>	<b>0.027*</b>	0.326



**Figure 6.** Production of N<sub>2</sub>O during potential and *in situ* DEA experiments. Vertical bars represent standard error (n=6). Asterisks indicate significant differences between control and impacted plots of the same mangrove zone. WS = wastewater supply, AFDM = ash-free dry mass. (\*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ ).

In impacted areas, the DEA was increased by 2.2 and 11 times, in *C. tagal* and *R. mucronata* zones, respectively. A similar tendency was observed for *in situ* DEA, with significant effects of mangrove zone and WS (Table 5). Nevertheless, post-hoc tests showed no significant difference of *in situ* DEA between control and impacted areas, certainly due to the high variability of data (Figure 6). The ratio of N<sub>2</sub>O production without/with acetylene in the

potential DEA experiment was very low (0.13 in mean), with no difference according to WS or mangrove zone.

#### 4. Discussion

The choice of working with artificial substrates rather than directly on the sediment aimed at studying the dynamics of biofilm colonization in the context of wastewater supply. No clear dynamics could be observed on any area (impacted and control areas in *Ceriops tagal* and *Rhizophora mucronata* dominated zones), neither in the  $\alpha$ -diversity nor in the structure of the communities. Therefore, the different samplings have been considered together. Though the colonization on substrates may induce a bias, the microbial communities still reflects the microorganisms living within the sediments. In impacted areas, this pool of microorganisms has been under the influence of WS for 4.5 to 5 years.

In the experiment, the WS strongly impacted directly or indirectly the chemical and physical environment of the benthic organisms. It should be noted that unlike urban or industrial effluent, these domestic wastewaters from a small village should not contain heavy metals or oil pollution. The influence of WS on the mangrove areas varied according to the season. For instance, during the rainy season, the differences between *Ceriops tagal* control and impacted areas were smaller than during the dry season (see Figure 2). This may be linked to the fact that the pipe network that collected the raw wastewaters was not fully watertight, which caused a dilution of the effluent when the rains were abundant. Moreover, the latter may also directly dilute the pretreated wastewaters while they are spread onto the soil surface. Otherwise, during the rainy season the volume of freshwater inputs through the WS is negligible compared to the rainfalls.

The impact of WS also depended on the dominant tree. It was more marked on the *Rhizophora mucronata* plot than on the *C. tagal* one, notably in terms of nutrient concentrations. This was unexpected because the *R. mucronata*-dominated zone is closer to the lagoon and more often subjected to the tides than the *C. tagal*-dominated zone. Therefore, this indicates that the nutrients were successfully retained in the system and were not removed by the sea during the high tide and carried to the lagoon. This is a crucial point for the use of natural mangrove as a buffer zone between the pretreatment of wastewaters and the lagoon.

The indirect impacts of WS were linked to alterations of the vegetation and fauna. Herteman *et al.* (2011) had shown that the vegetation was visibly modified within 2 years of WS, notably with an increase of tree growth and leaf surface. The consequences were a higher input of organic C (litter) and a lower incident light on the impacted plots. The latter consequence induced a significant decrease of surface water temperature (see Tables 2, 3). This was more marked on the *C. tagal* areas, where the difference of the mean temperature between control and impacted plot reached 5°C during the dry season. Such a difference may significantly affect the microbial activities such as nitrification or denitrification (Bai et al. 2013a) but also the microbial composition of some communities (Wallenstein et al. 2006).

The density of crab holes decreased markedly on *R. mucronata* plots (see Tables 2, 3). In the mangroves, crabs are engineer species that play a critical role notably on the physico-chemistry of sediment (Antunes et al. 2012). Their activity of bioturbation, through the holes and galleries they dig, directly modifies the nutrient and gas distribution which in turn influences microbial diversity and activity. A decrease in sediment permeability to gas, as a consequence of less crab holes, may for instance negatively impact AOA and AOB. Since in the experiment the biofilms were grown on artificial substrates at the sediment surface, we did not measure the redox potential in the sediment depth. Nevertheless, this may modify the pool of available species for substrate colonization. Some additional parameters like pH, sediment structure, organic matter, magnesium, potassium have not been taken into account, the present study focusing on nutrient input.

The presence of wastewaters strongly impacted the microbial communities grown on the artificial substrates, in both mangrove zones. A previous study has shown that benthic microalgal communities were strongly modified by the WS on the *R. mucronata* impacted area (Andras et al. 2012). In the present study, the structure, species richness and density of some microbial communities were modified. The issue of multiple copies of 16S gene was not taken into account, the qPCR was used as an approximation of bacterial density. Similarly to our results, only a marginal increase in bacterial density has been observed in sediments of a mangrove submitted to anthropogenic inputs (Fernandes et al. 2014). None of the environmental parameter we considered seemed to significantly influence the structure of the bacterial community, contrary to the mangrove zone (see Supplementary Material Table 4). Besides differences in physico-chemical conditions, the dominant tree species was shown to strongly influence microbial (bacterial or archaeal) communities in mangroves (Li et al. 2011b, Wang et al. 2015). Bai et al. (2013b) evidenced that microbial communities in various

mangrove forests were notably shaped by total nitrogen, total carbon, C/N ratio and salinity. It is possible that the total content of carbon (not measured) may have been a critical parameter for the bacterial communities. Salinity has been recognized as the main determinant of microbial community structures after a meta-analysis from 111 studies (Lozupone and Knight 2007). In the present study, the range of salinity values (27-38 psu) may have been too low to be the main driver of community structure. However, it was sufficient to affect the archaeal richness and abundance. Dias et al. (2011) observed significant effects of anthropogenic pressure on archaeal communities, with a strong influence of salinity. Here, the archaeal and eukaryotic diversities were influenced, depending on the season, by the temperature, crab holes density, litter and nitrite and phosphate concentrations but not by salinity. The first 3 parameters were indirectly modified by WS. This result emphasizes the importance of biotic macro-modifications of the ecosystem on microbial communities. The direct effect of nutrient input had a lesser impact. Another study comparing archaeal communities from pristine and anthropogenically-influenced mangroves emphasized the importance of magnesium, potassium and organic matter in shaping communities (Mendes et al. 2012). The pH also seems to be critical (e.g. Taketani et al. 2010).

In the prospect of biopurification, special attention was given to the microbial communities involved in the nitrogen cycle. The nitrogen input through WS was in the form of ammonium (see Table 1), which is transformed in the surface sediments by ammonia-oxidizing microorganisms into nitrite and nitrate. The latter are further released from the system after transformation under anaerobic conditions into nitrous oxide and nitrogen gas. The process of aerobic nitrification can be executed by some bacteria (AOB) and some archaea (AOA). The relative importance of AOA and AOB, both in terms of abundance and diversity, seems to be very variable. In our study, the  $\alpha$ -diversity of AOA was slightly higher and the ratio AOA/AOB (qPCR results) was on average 15.3. This may be explained by the higher affinity of AOA for ammonia, which allows their domination in environments with relatively low concentrations (Wang et al. 2014a) unlike AOB and by their ability to use small organic compounds (mixotrophy) (Pester et al. 2011). Differences in the ability of AOA and AOB to colonize the artificial substrates may also contribute to this high ratio. Though AOA remained largely dominant, the WS induced a significant decrease of the ratio AOA/AOB (see Figure 3E). This may be linked to the strong increase in ammonium concentration on the impacted plots (Erguder et al. 2009). Comparable ratios (between 1.8 and 6.4) were observed by Cao et al. (2011) in a similar context, i.e. in mangrove sediments exposed to urban inputs. In contrast, much lower



values (0.015-0.7) were found in microcosms of mangrove sediments amended with ammonium and nitrite, indicating a dominance of AOB (Li and Gu 2013). Therefore, it is hard to predict which ammonia-oxidizer community will prevail. Nevertheless, the abundances of bacterial and archaeal *amoA* genes were marginally correlated ( $p=0.059$ ) and the richness of both communities were positively correlated. Moreover, the structures of both AOA and AOB communities were influenced by the same parameters during the rainy season. However, they responded differently to WS, as shown by the fact that WS effect was higher during the dry season for AOA community structure, and higher during the rainy season for the AOB community structure (see Figure 5). Here again, this may be linked to differential influence of ammonium concentration on both communities since the variations of ammonium concentration between control and impacted areas strongly depended on the season.

Quantitatively, the responses of AOA and AOB to WS were also contrasted. The number of copies of bacterial *amoA* tended to increase in both impacted areas (significantly on *R. mucronata* area) while the number of copies of archaeal *amoA* was not significantly modified by WS (see Figure 3C, D).

Our data only provided information on the presence of the microorganisms, but not on their activity. Wang et al. (2015) quantified the transcripts from AOA and AOB in mangrove sediment microcosms and found an abundance of AOB transcripts hundreds of times higher than those of AOA while the ratio of *amoA* gene copies AOA/AOB was between 0.16 and 0.28. They concluded that the activity of AOB was the more significant in N metabolism in mangrove forests.

The removal of N from the system relies on denitrification and anammox. Since the latter seems to be of less importance in mangroves (Fernandes et al. 2012, Amano et al. 2011), we mainly considered denitrifying bacteria in this study. Though the specific richness of denitrifying bacteria communities only increased on *R. mucronata* area during the dry season, the WS strongly modified the structures of denitrifier communities and increased their density. The main environmental determinants were quite different between *nirK* and *nosZ* denitrifiers. Such dissimilarities have been observed by Wang et al. (2014b) when studying the effects of vegetation, tide and depth on both community types and by Weng et al. (2013) during experimental additions of nitrate and ammonium to mangrove sediments. As it could be expected, nitrogen concentration in sediments was one of the main drivers of denitrifier communities in our experiment. It was shown that in mangroves denitrifying bacteria are nitrate-limited (Fernandes and Bharathi 2011). In our *in situ* experiment, WS induced an

increase of nitrate concentration during the dry season. Nevertheless, the concentration remained rather low. This may be due either to a low activity of ammonia-oxidizing organisms in the production of nitrate, or to a high denitrifying activity which maintains low concentrations of nitrate. The observed modifications on the density of denitrifying bacteria were consistent with the tendency of an enhancement of potential and *in situ* denitrification observed during the rainy season. Unfortunately, because of technical issues the activity measurements have not been done during the dry season. Similarly to our results, it has been demonstrated in a field study that denitrification rates were enhanced in mangroves subjected to nutrient-rich inputs, in this case shrimp farm effluent (Molnar et al. 2013).

Our results pointed to the fact that besides nitrogen and organic carbon concentrations, phosphate was a strong determinant for microbial diversity of all the considered communities. Interestingly, it was shown in subtropical estuary sediments that the structure of microbial communities was strongly modified by P-enrichment and not by N-enrichment (Guevara et al. 2014). In mangroves, at the interface between marine and terrestrial environments, the vegetation can be limited either by P or N, with possible shifts along an ecotonal gradient (Feller et al. 2003). The presence of phosphate in wastewater may not only have a direct effect on microbial communities, but also an indirect effect through the increase of vegetation growth.

## **5. Conclusion**

The long-term release of pretreated wastewaters profoundly modified the environment of microbial communities on mangrove sediment surface, with strong consequences on their structure and densities, as seen on the microorganisms able to colonize the substrates. No negative effect on the diversity was observed and the total density of bacteria and the densities of denitrifying and nitrifying bacteria were increased. However, the latter mainly increased on *R. mucronata* impacted area, compared to *C. tagal* impacted area. The structures of denitrifier communities were also more modified on *R. mucronata* impacted area (see Figure 5). This suggests that the mangrove zone dominated by *C. tagal* may be less suitable for a biopurification purpose than the one dominated by *R. mucronata*. The higher potential for denitrification in *R. mucronata* impacted plot leads to the same conclusion. However, these results need to be confirmed by the quantification of gene transcripts in order to better assess the impact of WS on microbial activities. Though the *C. tagal* plot seems slightly less effective for the biopurification, this mangrove zone is the most distant from the lagoon, which lowers the risk of direct contamination of the latter.

The concentration of phosphorus in wastewaters appeared to be a critical direct and/or indirect determinant for the microbial communities, including those involved in N-cycling. The ratio N/P in the wastewaters will therefore condition the microbial community response in the impacted plots, directly or through the response of vegetation. The choice of pretreatment process type, by modifying the nitrogen form and the ratio N/P, will impact the ability of mangroves to withstand the excess of nutrients supply without a significant modification of ecosystem functioning. Finally, the lower differences between some control and impacted communities observed in the rainy season (April 2013) compared to the dry season (October 2012), associated with lower differences in environmental parameters, imply fast resilience capacities of the microbial communities

## 6. Acknowledgements

We are grateful to the Syndicat Intercommunal d'Eau et d'Assainissement de Mayotte (SIEAM) for the maintenance of the experimental system, and to the Plateforme GeT (Génome et Transcriptome) I2MC/UMR1048 from Génopole Toulouse, for the qPCR analyses.

**Funding:** This work was supported by the the Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA).

## References

- Holguin, G., Vazquez, P. and Bashan, Y. (2001) The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biology and Fertility of Soils* 33(4), 265-278.
- Boto, K.G. and Wellington, J.T. (1984) Soil characteristics and nutrient status in a Northern Australian mangrove forest. *Estuaries* 7(1), 61-69.
- Alongi, D.M. (2002) Present state and future of the world's mangrove forests. *Environmental Conservation* 29(3), 331-349.
- Nedwell, D.B., Blackburn, T.H. and Wiebe, W.J. (1994) Dynamic nature of the turnover of organic-carbon, nitrogen and sulfur in the sediments of a Jamaican mangrove forest. *Marine Ecology Progress Series* 110(2-3), 223-231.
- Wang, M., Zhang, J.H., Tu, Z.G., Gao, X.Q. and Wang, W.Q. (2010) Maintenance of estuarine water quality by mangroves occurs during flood periods: A case study of a subtropical mangrove wetland. *Marine Pollution Bulletin* 60(11), 2154-2160.
- Holguin, G., Gonzalez-Zamorano, P., De-Bashan, L.E., Mendoza, R., Amador, E. and Bashan, Y. (2006) Mangrove health in an environment encroached by urban development - a case study. *Science of the Total Environment* 363(1-3), 260-274.
- Nedwell, D.B. (1975) Inorganic nitrogen-metabolism in a eutrophicated tropical mangrove estuary. *Water Research* 9(2), 221-231.

Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., Lan, C.Y. and Wang, L.N. (1998) Litter production and decomposition in a subtropical mangrove swamp receiving wastewater. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 226(1), 1-18.

Tam, N.F.Y. and Wong, Y.S. (1995) Mangrove soils as sinks for waste-water borne pollutants. *Hydrobiologia* 295(1-3), 231-241.

Wong, Y.S., Lan, C.Y., Chen, G.Z., Li, S.H., Chen, X.R., Liu, Z.P. and Tam, N.F.Y. (1995) Effect of waste-water discharge on nutrient contamination of mangrove soils and plants. *Hydrobiologia* 295(1-3), 243-254.

Tam, N.F.Y. and Wong, Y.S. (1996) Retention and distribution of heavy metals in mangrove soils receiving wastewater. *Environmental Pollution* 94(3), 283-291.

Tam, N.F.Y., Wong, A.H.Y., Wong, M.H. and Wong, Y.S. (2009) Mass balance of nitrogen in constructed mangrove wetlands receiving ammonium-rich wastewater: Effects of tidal regime and carbon supply. *Ecological Engineering* 35(4), 453-462.

Su, Y.M., Lin, Y.F., Jing, S.R. and Hou, P.C.L. (2011) Plant growth and the performance of mangrove wetland microcosms for mariculture effluent depuration. *Marine Pollution Bulletin* 62(7), 1455-1463.

Wu, Y., Chung, A., Tam, N.F.Y., Pi, N. and Wong, M.H. (2008) Constructed mangrove wetland as secondary treatment system for municipal wastewater. *Ecological Engineering* 34(2), 137-146.

Yang, Q., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., Luan, T.G., Su, W.S., Lan, C.Y., Shin, P.K.S. and Cheung, S.G. (2008) Potential use of mangroves as constructed wetland for municipal, sewage treatment in Futian, Shenzhen, China. *Marine Pollution Bulletin* 57(6-12), 735-743.

Herteman, M., Fromard, F. and Lambs, L. (2011) Effects of pretreated domestic wastewater supplies on leaf pigment content, photosynthesis rate and growth of mangrove trees: A field study from Mayotte Island, SW Indian Ocean. *Ecological Engineering* 37(9), 1283-1291.

Lambs, L., Leopold, A., Zeller, B., Herteman, M. and Fromard, F. (2011) Tracing sewage water by N-15 in a mangrove ecosystem to test its bioremediation ability. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 25(19), 2777-2784.

Muangchinda, C., Pansri, R., Wongwongsee, W. and Pinyakong, O. (2013) Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation potential in mangrove sediment from Don Hoi Lot, Samut Songkram Province, Thailand. *Journal of Applied Microbiology* 114(5), 1311-1324.

Alongi, D.M. (1988) Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove systems. *Microbial Ecology* 15(1), 59-79.

Dias, A.C.F., Hoogwout, E.F., Silva, M., Salles, J.F., van Overbeek, L.S. and van Elsas, J.D. (2012) Potato cultivar type affects the structure of ammonia oxidizer communities in field soil under potato beyond the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 50, 85-95.

Andreote, F.D., Jimenez, D.J., Chaves, D., Dias, A.C.F., Luvizotto, D.M., Dini-Andreote, F., Fasanella, C.C., Lopez, M.V., Baena, S., Taketani, R.G. and de Melo, I.S. (2012) The Microbiome of Brazilian Mangrove Sediments as Revealed by Metagenomics. *Plos One* 7(6).

Fernandes, S.O., Michotey, V.D., Guasco, S., Bonin, P.C. and Bharathi, P.A.L. (2012) Denitrification prevails over anammox in tropical mangrove sediments (Goa, India). *Marine Environmental Research* 74, 9-19.

Li, M., Cao, H.L., Hong, Y.G. and Gu, J.D. (2011a) Spatial distribution and abundances of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in mangrove sediments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89(4), 1243-1254.

Braker, G., Zhou, J.Z., Wu, L.Y., Devol, A.H. and Tiedje, J.M. (2000) Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific northwest marine sediment communities. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5), 2096-2104.

Li, M., Hong, Y.G., Cao, H.L. and Gu, J.D. (2011b) Mangrove trees affect the community structure and distribution of anammox bacteria at an anthropogenic-polluted mangrove in the Pearl River Delta reflected by 16S rRNA and hydrazine oxidoreductase (HZO) encoding gene analyses. *Ecotoxicology* 20(8), 1780-1790.

Wang, Y.F., Li, X.Y. and Gu, J.D. (2014a) Differential responses of ammonia/ammonium-oxidizing microorganisms in mangrove sediment to amendment of acetate and leaf litter. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(7), 3165-3180.

Li, M. and Gu, J.D. (2013) Community structure and transcript responses of anammox bacteria, AOA, and AOB in mangrove sediment microcosms amended with ammonium and nitrite. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(22), 9859-9874.

Amano, T., Yoshinaga, I., Yamagishi, T., Chu, V.T., Pham, T.T., Ueda, S., Kato, K., Sako, Y. and Suwa, Y. (2011) Contribution of Anammox Bacteria to Benthic Nitrogen Cycling in a Mangrove Forest and Shrimp Ponds, Haiphong, Vietnam. *Microbes and Environments* 26(1), 1-6.

Tam, N.F.Y. (1998) Effects of wastewater discharge on microbial populations and enzyme activities in mangrove soils. *Environmental Pollution* 102(2-3), 233-242.

Wang, H.T., Su, J.Q., Zheng, T.L. and Yang, X.R. (2014b) Impacts of vegetation, tidal process, and depth on the activities, abundances, and community compositions of denitrifiers in mangrove sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(22), 9375-9387.

Wang, H.T., Su, J.Q., Zheng, T.L. and Yang, X.R. (2015) Insights into the role of plant on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in the mangrove ecosystem. *Journal of Soils and Sediments* 15(5), 1212-1223.

Luo, Z.X., Qiu, Z.Z., Wei, Q.S., Du Laing, G., Zhao, Y.L. and Yan, C.Z. (2014) Dynamics of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in relation to nitrification along simulated dissolved oxygen gradient in sediment-water interface of the Jiulong river estuarine wetland, China. *Environmental Earth Sciences* 72(7), 2225-2237.

Cao, H.L., Li, M., Hong, Y.G. and Gu, J.D. (2011) Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in polluted mangrove sediment. *Systematic and Applied Microbiology* 34(7), 513-523.

Basak, P., Majumder, N.S., Nag, S., Bhattacharyya, A., Roy, D., Chakraborty, A., SenGupta, S., Roy, A., Mukherjee, A., Pattanayak, R., Ghosh, A., Chattopadhyay, D. and Bhattacharyya, M. (2015) Spatiotemporal Analysis of Bacterial Diversity in Sediments of Sundarbans Using Parallel 16S rRNA Gene Tag Sequencing. *Microbial Ecology* 69(3), 500-511.

Chakraborty, A., Bera, A., Mukherjee, A., Basak, P., Khan, I., Mondal, A., Roy, A., Bhattacharyya, A., SenGupta, S., Roy, D., Nag, S., Ghosh, A., Chattopadhyay, D. and Bhattacharyya, M. (2015) Changing bacterial profile of Sundarbans, the world heritage mangrove: Impact of anthropogenic interventions. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 31(4), 593-610.

Fernandes, S.O., Kirchman, D.L., Michotey, V.D., Bonin, P.C. and LokaBharathi, P.A. (2014) Bacterial diversity in relatively pristine and anthropogenically-influenced mangrove ecosystems (Goa, India). *Brazilian Journal of Microbiology* 45(4), 1161-1171.

APHA, AWWA and XPVF (1992) Standards methods for the examination of water and wastewater, American Public Health Association, Washington, DC.

Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H. and Wawer, C. (1997) *Molecular Microbial Ecology Manual*. Akkermans, A.D.L., Van Elsas, J.D. and De Bruijn, F.J. (eds), pp. 1-27, Kluwer Academics, Dordrecht.

Pires, A.C.C., Cleary, D.F.R., Almeida, A., Cunha, A., Dealtry, S., Mendonca-Hagler, L.C.S., Smalla, K. and Gomes, N.C.M. (2012) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and

Barcoded Pyrosequencing Reveal Unprecedented Archaeal Diversity in Mangrove Sediment and Rhizosphere Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 78(16), 5520-5528.

Clark, I.M., Buchkina, N., Jhurrea, D., Goulding, K.W.T. and Hirsch, P.R. (2012) Impacts of nitrogen application rates on the activity and diversity of denitrifying bacteria in the Broadbalk Wheat Experiment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 367(1593), 1235-1244.

Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., DeBoer, W., Prosser, J.I., Embley, T.M. and Woldendorp, J.W. (1997) Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 63(4), 1489-1497.

Muyzer, G., Dewaal, E.C. and Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S ribosomal RNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59(3), 695-700.

Tourna, M., Freitag, T.E., Nicol, G.W. and Prosser, J.I. (2008) Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environmental Microbiology* 10(5), 1357-1364.

Breitenbeck, G.A. and Bremner, J.M. (1987) Effects of storing soils at various temperatures on their capacity for denitrification *Soil Biology & Biochemistry* 19(4), 377-380.

Sorensen, J. (1978) Denitrification rates in a marine sediment as measured by acetylene inhibition technique. *Applied and Environmental Microbiology* 36(1), 139-143.

Philippot, L., Andert, J., Jones, C.M., Bru, D. and Hallin, S. (2011) Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N<sub>2</sub>O emissions from soil. *Global Change Biology* 17(3), 1497-1504.

Delarue, F., Buttler, A., Bragazza, L., Grasset, L., Jassey, V.E.J., Gogo, S. and Laggoun-Defarge, F. (2015) Experimental warming differentially affects microbial structure and activity in two contrasted moisture sites in a Sphagnum-dominated peatland. *Science of the Total Environment* 511, 576-583.

Bai, E., Li, S.L., Xu, W.H., Li, W., Dai, W.W. and Jiang, P. (2013a) A meta-analysis of experimental warming effects on terrestrial nitrogen pools and dynamics. *New Phytologist* 199(2), 441-451.

Wallenstein, M.D., Myrold, D.D., Firestone, M. and Voytek, M. (2006) Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: Insights from molecular methods. *Ecological Applications* 16(6), 2143-2152.

Antunes, J.T., Leao, P.N. and Vasconcelos, V.M. (2012) Influence of biotic and abiotic factors on the allelopathic activity of the cyanobacterium *cylindrospermopsis raciborskii* Strain LEGE 99043. *Microbial Ecology* 64(3), 584-592.

Andras, T.D., Alexander, T.S., Gahlana, A., Parry, R.M., Fernandez, F.M., Kubanek, J., Wang, M.D. and Hay, M.E. (2012) Seaweed Allelopathy Against Coral: Surface Distribution of a Seaweed Secondary Metabolite by Imaging Mass Spectrometry. *Journal of Chemical Ecology* 38(10), 1203-1214.

Bai, S.J., Li, J.W., He, Z.L., Van Nostrand, J.D., Tian, Y., Lin, G.H., Zhou, J.Z. and Zheng, T.L. (2013b) GeoChip-based analysis of the functional gene diversity and metabolic potential of soil microbial communities of mangroves. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(15), 7035-7048.

Lozupone, C.A. and Knight, R. (2007) Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(27), 11436-11440.

Dias, A.C.F., Dini-Andreote, F., Taketani, R.G., Tsai, S.M., Azevedo, J.L., de Melo, I.S. and Andreote, F.D. (2011) Archaeal communities in the sediments of three contrasting mangroves. *Journal of Soils and Sediments* 11(8), 1466-1476.

Mendes, L.W., Taketani, R.G., Navarrete, A.A. and Tsai, S.M. (2012) Shifts in phylogenetic diversity of archaeal communities in mangrove sediments at different sites and depths in southeastern Brazil. *Research in Microbiology* 163(5), 366-377.

Taketani, R.G., Franco, N.O., Rosado, A.S. and van Elsas, J.D. (2010) Microbial Community Response to a Simulated Hydrocarbon Spill in Mangrove Sediments. *Journal of Microbiology* 48(1), 7-15.

Pester, M., Schleper, C. and Wagner, M. (2011) The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Current Opinion in Microbiology* 14(3), 300-306.

Erguder, T.H., Boon, N., Wittebolle, L., Marzorati, M. and Verstraete, W. (2009) Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. *FEMS Microbiology Reviews* 33(5), 855-869.

Weng, B.S., Xie, X.Y., Yang, J.J., Liu, J.C., Lu, H.L. and Yan, C.L. (2013) Research on the nitrogen cycle in rhizosphere of *Kandelia obovata* under ammonium and nitrate addition. *Marine Pollution Bulletin* 76(1-2), 227-240.

Fernandes, S.O. and Bharathi, P.A.L. (2011) Nitrate levels modulate denitrification activity in tropical mangrove sediments (Goa, India). *Environmental Monitoring and Assessment* 173(1-4), 117-125.

Molnar, N., Welsh, D.T., Marchand, C., Deborde, J. and Meziane, T. (2013) Impacts of shrimp farm effluent on water quality, benthic metabolism and N-dynamics in a mangrove forest (New Caledonia). *Estuarine Coastal and Shelf Science* 117, 12-21.

Guevara, R., Ikenaga, M., Dean, A.L., Pisani, C. and Boyer, J.N. (2014) Changes in Sediment Bacterial Community in Response to Long-Term Nutrient Enrichment in a Subtropical Seagrass-Dominated Estuary. *Microbial Ecology* 68(3), 427-440.

Feller, I.C., McKee, K.L., Whigham, D.F. and O'Neill, J.P. (2003) Nitrogen vs. phosphorus limitation across an ecotonal gradient in a mangrove forest. *Biogeochemistry* 62(2), 145-175.

## Supplementary Material

**SM Table 1.** PCR primers (from Invitrogen-ThermoFischer, Carlsbad, California), and thermal conditions.

Target	Gene	Method	Primers	Sequence (5′ – 3′)	Thermal conditions			Nb of cycles	type	References
Bacteria	16S-23S spacer	ARISA	ITSF	GTCGTAACAAGGTAGCCGTA	94°C, 1 min	56°C, 1 min	72°C, 2 min	35	classic	Cardinale et al. (2004)
			ITSReub-5FAM*	<sup>a</sup> FAM-GCCAAGGCATCCACC						
	16S	qPCR	Primer P1	CCTACGGGAGGCAGCAG	95°C, 15 s	61.5°C, 45 s	-	40	classic	Muyzer et al. (1993)
			Primer P2	ATTACCGCGGCTGCTGG						
Eukaryota	18S-28S spacer	ARISA	3126T	ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT	94°C, 1 min	56°C, 1 min	72°C, 2 min	35	classic	Ranjard et al. (2001)
			2234C-5FAM*	<sup>a</sup> FAM-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC						
Archaea	16S	Nested	ARC344f-mod	ACGGGGYGCASSAGKCGVGA	94°C, 1 min	56°C, 1 min	72°C, 1 min	30	classic	Pires et al. (2012)
			Arch958R-mod	YCCGGCGTTGAVTCCAATT						
		DGGE	524F-10	GCCGCGGTAA	94°C, 1 min	50°C, 1 min	72°C, 1 min	35	classic	Pires et al. (2012)
			Arch958R-mod	<sup>1</sup> CCCGGCGTTGAVTCCAATT						
Denitrifying bacteria	<i>nirK</i>	DGGE	nirKFlaCu	ATCATGGTCTGCCGCG	98°C, 45 s	53°C, 30 s	72°C, 30 s	30	classic	Clark et al. (2012)
			nirKR3Cu	<sup>1</sup> GCCTCGATCAGRTTGTTGTT						
	<i>nosZ</i>	DGGE	nosZF	CGYTGTTCMTGACAGCCAG	98°C, 1 min	65°C-55°C, 1 min	72°C, 1 min	9 and 19	Touch down	Clark et al. (2012)
			nosZ1622RC	<sup>1</sup> CGSACCTTSTTGCCSTYGCG						
	<i>nosZ</i> clade I	PCR	nosZ1F	WCSYTGTTTCMTGACAGCCAG	95°C, 15 s	67°C-62°C, 30 s	72°C, 30 s	6 and 35	Touch down	(Henry <i>et al.</i> , 2006)
			nosZ2R	ATGTCGATCARCTGVKCRTTYTC						
		qPCR	nosZ1F	WCSYTGTTTCMTGACAGCCAG	95°C, 10 s	67°C-62°C, 45 s	-	6 and 40	Touch down	Henry et al. (2006)
			nosZ2R	ATGTCGATCARCTGVKCRTTYTC						
AOB	Bacterial <i>amoA</i>	Nested	Mix of: CTO A	<sup>2</sup> GGAGAAAAGCAGGGGATCG	92°C, 30 s	57°C, 1 min	68°C, 45 s	35	classic	Dias et al. (2012), Kowalchuk et al. (1997)
			CTO B	<sup>2</sup> GGAGGAAAGCAGGGGATCG						





**SM Table 2.** P-values for post-hoc tests following NP-MANOVA analyses of environmental parameters matrix. In italic, p-values for the dry season, in bold p-values for the rainy season.

	<i>R. mucronata</i> control	<i>R. mucronata</i> impacted	<i>C. tagal</i> control	<i>C. tagal</i> impacted
<i>R. mucronata</i> control	0	<i>0.0299</i>	<i>0.0273</i>	<i>0.0294</i>
<i>R. mucronata</i> impacted	<b>0.0299</b>	0	<i>0.0300</i>	<i>0.0281</i>
<i>C. tagal</i> control	<b>0.0273</b>	<b>0.0281</b>	0	<i>0.0575</i>
<i>C. tagal</i> impacted	<b>0.0294</b>	<b>0.0300</b>	<b>0.0281</b>	0

**SM Table 3.** Mean number of OTU detected with ARISA and DGGE analyses and results of two-way ANOVA performed on these data (n = 4). Significant p-values are in bold. Mang. Zone = mangrove zone, WS = wastewater supply. (\*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ ).

	season	nbr of OTU (mean $\pm$ SE)	Results of 2-way ANOVAs		
			Mang. zone	WS	Mang. zone*WS
Eukaryota (ARISA)	dry	18.5 $\pm$ 0.8	0.334	0.157	0.263
	rainy	21.7 $\pm$ 1.0	0.847	0.286	0.157
Bacteria (ARISA)	dry	20.7 $\pm$ 0.7	0.181	0.645	0.181
	rainy	24.4 $\pm$ 0.7	0.808	0.935	0.381
Archaea (DGGE)	dry	66.8 $\pm$ 1.3	0.194	0.788	<b>0.0001***</b>
	rainy	89.4 $\pm$ 3.4	0.165	0.407	0.631
Denitrifying Bacteria <i>nirK</i> (DGGE)	dry	36 $\pm$ 1.8	0.099	0.944	0.275
	rainy	44.5 $\pm$ 1.9	0.805	0.666	0.303
Denitrifying Bacteria <i>nosZ</i> (DGGE)	dry	38.8 $\pm$ 1.8	0.258	0.228	<b>0.022*</b>
	rainy	43.8 $\pm$ 1.3	0.667	0.274	1
AOB (DGGE)	dry	55.2 $\pm$ 1.3	0.068	0.725	0.4
	rainy	50.4 $\pm$ 1.2	<b>0.031*</b>	0.597	<b>0.015*</b>
AOA (DGGE)	dry	82.3 $\pm$ 2.2	0.467	0.499	0.499
	rainy	55.9 $\pm$ 2.0	0.206	0.737	<b>0.022*</b>

**SM Table 4.** Results of NP-MANOVAs performed on the diversity matrixes obtained for each microbial community with ARISA or DGGE techniques. Mang. Zone = mangrove zone, WS = wastewater supply. (\*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ ,  $n = 4$ ).

2-way NP-MANOVA				
	season	Mang. zone	WS	Mang. zone*WS
Eukaryota	dry	<b>0.0002***</b>	<b>0.0003***</b>	0.3881
	rainy	<b>0.0017**</b>	<b>0.0058**</b>	0.6293
Bacteria	dry	<b>0.001***</b>	<b>0.0001***</b>	<b>0.0291*</b>
	rainy	0.0898	<b>0.0018**</b>	0.3241
Archaea	dry	<b>0.0001***</b>	<b>0.0057**</b>	<b>0.0211*</b>
	rainy	<b>0.0001***</b>	<b>0.0003***</b>	<b>0.0184*</b>
Denitrifying Bacteria <i>nirK</i>	dry	<b>0.0007***</b>	<b>0.0001***</b>	<b>0.019*</b>
	rainy	<b>0.0001***</b>	<b>0.0006***</b>	<b>0.0147*</b>
Denitrifying Bacteria <i>nosZ</i>	dry	0.2993	<b>0.0038**</b>	0.2994
	rainy	<b>0.0001***</b>	<b>0.0001***</b>	<b>0.0001***</b>
AOB	dry	<b>0.0001***</b>	<b>0.0045**</b>	<b>0.0275*</b>
	rainy	<b>0.0003***</b>	<b>0.0031**</b>	<b>0.0039**</b>
AOA	dry	<b>0.0001***</b>	<b>0.0235*</b>	0.0874
	rainy	<b>0.0001***</b>	<b>0.0116*</b>	<b>0.0075**</b>



**Chapitre 4 : Evaluation de la stabilité de la  
végétation et de la faune benthique (crabes et  
méiofaune) de mangrove face à une perturbation de  
long terme**



Ce chapitre fait l'objet d'un article scientifique paru dans la revue *Marine Pollution Bulletin* intitulé :

Limited impact of several years of pretreated wastewater discharge on the fauna and vegetation in a mangrove ecosystem (doi : 10.1016/j.marpolbul.2018.02.035)

Le chapitre précédent a révélé une forte modification des communautés microbiennes en réponse à une perturbation anthropique sur le long terme. L'objectif de ce chapitre est d'évaluer la réponse de la végétation et de la faune à cette même perturbation (apport journalier d'eau douce et de nutriments) et de maintenir le choix du faciès *C. tagal* comme étant le meilleur exutoire des EUD prétraitées en mangrove. Les compartiments végétation et faune sont indispensables au bon fonctionnement de l'écosystème mangrove. La végétation est le compartiment structurel de la mangrove (Tomlinson, 2016) et la faune comprend les crabes et la méiofaune qui font partie des espèces ingénieurs de la mangrove (Jones *et al.*, 1994). Une rupture fonctionnelle d'un de ces deux compartiments (disparition de 50 % des palétuviers ou de la quasi-totalité des crabes) entraînerait une disparition de la mangrove à terme (Saenger, 2002).

Ces deux compartiments ont été suivis *in situ* dans le site expérimental décrit dans le chapitre 3, après une exposition aux rejets d'EUD prétraitées de 4,5 à 6,5 ans. Notre hypothèse était qu'une mangrove insulaire stressée en nutriments, recevant des EUD riches en ammonium et phosphate pendant plusieurs années, devrait répondre par une augmentation de la croissance de sa végétation et par de faibles modifications de sa faune.

Les parcelles impactées (675 m<sup>2</sup> chacune) des faciès *C. tagal* et *R. mucronata* ont chacune été exposées à 10 m<sup>3</sup> d'EUD prétraitées par jour. Chacune d'entre elles était accompagnée d'une parcelle « témoin » équivalente, ne recevant pas les rejets. Des placettes d'étude ont été délimitées dans chaque parcelle afin d'étudier la structure des palétuviers (densité, composition spécifique, diamètre, hauteur, biomasse aérienne et souterraine, densité de régénération et mortalité), la production végétale, la croissance et le contenu pigmentaire des feuilles après 6,5 années de rejet. La structure de la végétation a aussi été comparée à d'autres mesures réalisées antérieurement après les six premiers mois de rejet. Les crabes ont été suivis sur 2 années dans des quadrats délimités dans chaque parcelle. Leur densité, leur composition spécifique, leur diversité, la densité de terrier et le diamètre du trou des terriers ont été mesurés après plus de

4,5 ans de rejet. La structure de la méiofaune a été étudiée après 4,5 ou 6,5 ans d'exposition aux rejets. Les pièces buccales des nématodes ont été observées par microscopie uniquement dans le faciès *C. tagal* pour déterminer la composition des groupes trophiques et des morphotypes des nématodes dans les parcelles impactée et témoin.

Les résultats ont montré une forte stimulation de la croissance des palétuviers en présence d'EUD depuis 6,5 années pour les deux faciès de végétation. Ceci s'est traduit par des augmentations de diamètre, de hauteur, d'aire basale, de biomasse végétale, de surface foliaire, de production de litière et de quantités de pigments dans les feuilles. Le faciès *C. tagal* a présenté une plus forte vitesse de croissance et le faciès *R. mucronata* une plus forte mortalité. De plus l'apport d'eau douce et de nutriments à long terme a modifié la structure de la communauté des crabes et de la méiofaune. En effet, les résultats ont révélé une forte augmentation des Sesarmidae au détriment des Ocypodidae pour les crabes des parcelles impactées. Pour la méiofaune, les EUD ont induit une augmentation des prédateurs et des effets négatifs sur les dépositores et les racleurs-perceurs. Cependant aucune influence des EUD n'a été observée sur la densité des crabes et de la méiofaune. Enfin, les résultats ont révélé que l'effet des EUD était plus fort sur la végétation et la méiofaune du faciès *C. tagal* alors que les crabes ont été plus impactés dans le faciès *R. mucronata*, ceci s'est accompagné d'une mortalité accrue des palétuviers.

En raison de ces deux derniers éléments observés dans le faciès *R. mucronata* après un impact à long terme des EUD, le faciès *C. tagal*, moins impacté, serait préférable pour la bio-épuration des EUD prétraitées en mangrove.



# Limited impact of several years of pretreated wastewater discharge on fauna and vegetation in a mangrove ecosystem

Capdeville C.<sup>a</sup>, Abdallah K.<sup>b</sup>, Buffan-Dubau E.<sup>a</sup>, Lin C.<sup>a</sup>, Azemar F.<sup>a</sup>, Lambs L.<sup>a</sup>, Fromard F.<sup>a</sup>, Rols J.L.<sup>a</sup>, Leflaive J.<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France

<sup>b</sup>Syndicat Intercommunal d'Eau et d'Assainissement de Mayotte, France

\*Corresponding author: josephine.leflaive@univ-tlse3.fr

EcoLab-Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement  
UMR 5245 CNRS-UPS-INPT  
Université Toulouse III - Paul Sabatier, Bât 4R1,  
118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 9

## Abstract

It was hypothesized that mangroves, tropical wetlands, could be used for the finishing treatment of domestic wastewaters. Our aim was to determine if a nutrient-stressed mangrove could tolerate long-term discharges of pretreated wastewater (PW). Since 2008, in an *in situ* experimental system set up in Mayotte Island (Indian Ocean), domestic PW are discharged into two impacted areas (675 m<sup>2</sup>) dominated by different species of mangrove trees. Anthropogenic inputs during more than 4.5 years led to an increase in vegetation growth associated with an increase in leaf pigment content, leaf surface and tree productivity. A marked increase in tree mortality was observed. There was no effect on crabs and meiofauna densities, but significant modifications of community structures. These effects may be directly linked to PW inputs, or indirectly to the modifications of the environment associated with higher tree growth. However, our results indicate that there was no major dysfunction the ecosystem.

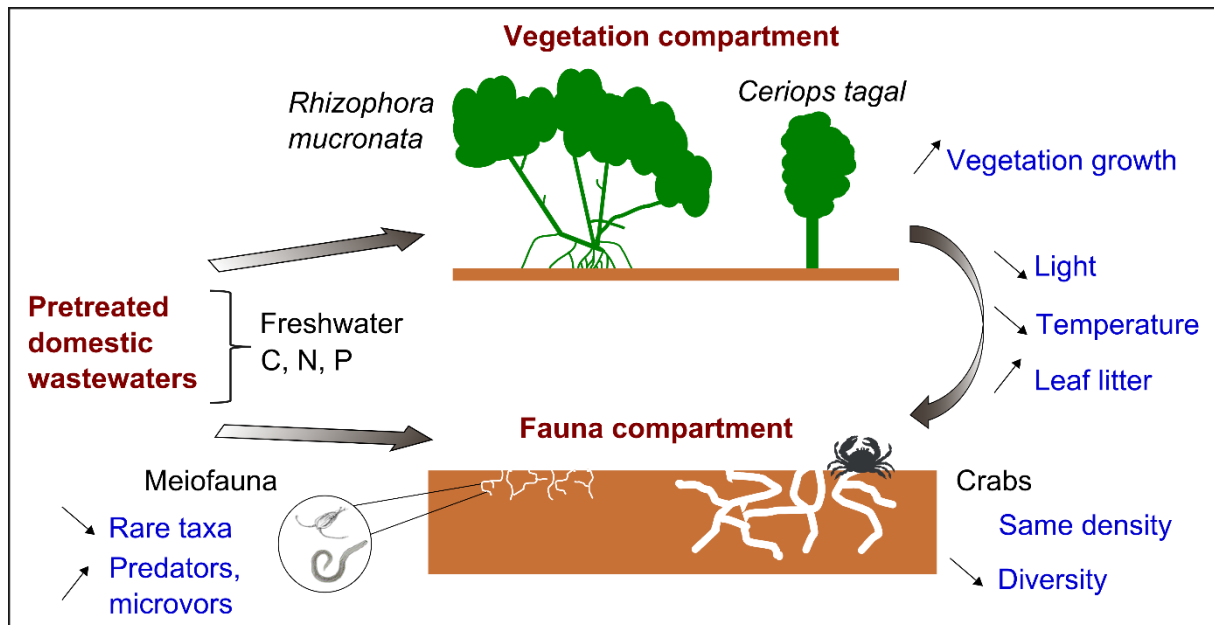
**Key words:** anthropic disturbance, long-term impact, vegetation, crab, meiofauna.

## Highlights

- Mangrove forests were proposed as receptacle for domestic wastewaters.
- The long-term responses of mangrove used for 4.5-6.5 years were studied *in situ*.

- Freshwater and nutrient inputs induced a significant increase of vegetation growth.
- Crab and meiofauna community structures were modified with no decrease of density.
- No major dysfunction of the ecosystem was observed after long-term anthropic input.

## Graphical abstract



## 1. Introduction<sup>1</sup>

Mangroves are coastal forests adapted to an intertidal environment in (sub)tropical areas (Blasco, 1991; Spalding et al., 1997). They are organized in strips of vegetation dominated by tree species arranged along environmental gradients (Robertson et al., 1992; Ball, 1998). These forests are nutrient-poor (Boto and Wellington, 1984) but highly productive and represent a large source of organic matter to decomposer communities (Benner and Hodson, 1985; Komiyama et al., 2000). Mangroves provide a number of ecosystem services like varied food

<sup>1</sup> PW: Pretreated Wastewater;  
*Ct*-CA and *Ct*-IA: Control and Impacted Area of *Ceriops tagal* mangrove zone;  
*Rm*-CA and *Rm*-IA: Control and Impacted Area of *Rhizophora mucronata* mangrove zone;  
 DBH: Diameter at Breast Height;  
 $\Delta$ RA: the difference of dead tree Relative Abundance;  
 AGB: Aboveground Biomass;  
 BGB: Belowground root Biomass;  
 SLA: Specific Leaf Area.

and material resources, and habitats for fishes, prawns and crabs (Aburto-Oropeza et al., 2008; Lee et al., 2014). They also participate to stabilize soils, protect coasts from erosion and cyclones (Blasco, 1991; Alongi, 2008). Moreover, mangroves are sites of major importance for nutrients trapping and organic matter remineralization (Ewel et al., 1998).

In contrast to the low diversity of tree species, the mangrove hosts a high diversity of organisms (Nagelkerken et al., 2008). Among these organisms, crabs received a particular attention because of their role as engineer species (Jones et al., 1994; Lee, 1998). Indeed, their habitat (often a hole) and their bioturbation activity induce physical modifications of their environment. This favors the oxygenation of the sediments (Smith et al., 1991) and the circulation of water and organic matter (Botto et al., 2006; Gutiérrez et al., 2006). Moreover, their feeding habits (burying leaves and propagules into their hole for some species) participate to the enrichment of sediments (Camilleri, 1992) and to the regulation of mangrove tree recruitment (McGuinness, 1997; Dahdouh-Guebas et al., 1999). Within sediments, especially in subsurface layers, meiofauna, *i.e.* benthic invertebrates between 30 and 1000  $\mu\text{m}$  (Giere, 2009), represent another important component of trophic networks because of its intermediate position between the microorganisms and higher trophic levels. These communities enhance organic matter biomineralization and the recycling of nutrients and organic carbon, enriching the coastal waters and making nutrients available for marine benthic communities (Chinnadurai and Fernando, 2007).

In addition to being continuously affected by natural pressures such as salinity gradients, soil instability, tidal cycle, light, temperature, and alternating seasons (Feller et al., 2010), mangroves are also often subjected to anthropogenic pressures because of their common proximity with urban and industrial centers, aquatic farms and ports (Delabie et al., 2006; Prasad, 2012; Zhang et al., 2014). Among the organisms living in mangrove ecosystems, mangrove trees and benthos are directly in contact with the pollutants potentially accumulated in the sediments such as heavy metals, organic contaminants, pesticides (Lewis et al., 2011; Zhang et al., 2014), oil spills (Duke, 2016), domestic or industrial wastewaters (Bartolini et al., 2011; Molnar et al., 2013). The reports of the impact of anthropogenic pollution can be very contrasted. It has been shown that oil spills and chemical compounds, contained in runoff from urban, industrial and agricultural areas, strongly affect the ecological functions and stabilization of mangrove ecosystem (Lewis et al., 2011; Zhang et al., 2014), and cause a lot of damages on

vegetation and fauna (Olguin et al., 2007; Lewis et al., 2011). In contrast, several studies demonstrated a bioaccumulation of heavy metal from sewages in crab tissues (Banci et al., 2017) without any effect on crab genetic diversity. In certain cases, the presence of pollutants can also induce positive effects on some organisms. For instance, organic pollution from human installations led to an increase of crab density for the fiddler crabs (Ocypodidae) while most of the macrobenthos (crabs and gastropods) was impoverished by the disturbance (Lee, 1995). Excess of nitrogen and/or phosphorus also stimulated the vegetation growth (Lovelock et al., 2004) and increased nematode density while an increase of organic carbon increased the density of meiofauna (Gómez Noguera and Hendrickx, 1997; Zhou et al., 2015).

Because of their visible resistance to certain pollutions, their peri-urban localization and their ability to absorb nutrients, it has been proposed to use mangroves as a finishing treatment for pretreated or untreated wastewaters (Wong et al., 1995, 1997). Several studies have considered the potential consequences for mangrove trees or fauna, with constructed mangrove in mesocosms (Penha-Lopes et al., 2009, 2010; Tam et al., 2009), in peri-urban mangroves exposed to a diffuse pollution (Cannicci et al., 2009) or along a pollution gradient of treated wastewaters (Wear and Tanner, 2007). In most cases, a positive effect (growth increase) was observed for the vegetation, while it was more contrasted for crabs. However, Lovelock et al. (2009) have shown with several long-term (3-12 years) nutrient-enrichment (N/P) experiments that an increase of nutrients could lead to higher tree mortalities and a canopy loss, which could severely impair the functioning of the whole ecosystem. This was observed in sites with low rainfalls and high salinity. Our hypothesis is that a nutrient-stressed insular mangrove, with a medium salinity, receiving a discharge of pretreated domestic wastewater (*i.e.* input of organic C, N, P and freshwater) during several years should respond by an increase of vegetation growth, along with little modification of fauna, since the latter appears rather resistant in literature. To demonstrate this hypothesis, mangrove compartments were followed with an *in situ* experimental system set up in Mayotte Island (Indian Ocean). This system uses mangrove as a receptacle / finishing treatment for PW discharges to avoid the direct discharge of wastewaters into the lagoon. Two different zones of mangrove daily receive a discharge of pretreated domestic wastewaters. A first survey of the vegetation after 6 to 12 months of PW discharge has revealed an increase of vegetation growth, leaf pigment content and photosynthesis (Herteman *et al.*, 2011). Here we present the response of vegetation after 4.5 to 6.5 year periods of PW discharge and the long-term responses of the crab community and meiofauna. To our knowledge, this is the first experience performed in a natural mangrove, in

controlled conditions, which allows to evaluate the consequences of using mangroves as a receptacle for pretreated domestic wastewaters.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study site

Since April 2008, an *in situ* experimental system has been running in the mangrove of Chirongui Bay, South-West of Mayotte Island, a French department located in the Mozambique Channel, South-West of Indian Ocean (12°55'S, 45°09'E). This island is characterized by a high tidal amplitude for an oceanic island, reaching up to 4 m in spring tides. The mangrove areas followed in the present study and the experimental system were the same as those described by Herteman *et al.* (2011). Shortly, domestic wastewaters from Malamani village (250 inhabitants-equivalent) are pretreated in a horizontal primary settlement tank with integrated sludge digester. The mean flow rates treated during the years 2013 and 2014 for wet and dry seasons were 27.3 and 24.7 m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup>, respectively. Then, pretreated wastewater (PW) are carried through a pipe network to two mangrove areas, respectively dominated by the mangrove trees *Ceriops tagal* (Perr.) C.B. Robinson and *Rhizophora mucronata* Lam. PW are discharged once a day during the low tide for one hour (10 m<sup>3</sup> per area) in each mangrove areas (around 675 m<sup>2</sup> for each area), giving an hydraulic loading rate of 14.8 L.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>, which is equivalent to a rainfall event of 14.8 mm. Near these two “impacted” areas (IA) (at about 15 m), two other areas not subjected to PW discharge were used as “control” areas (CA). The *R. mucronata*-dominated control and impacted areas (*Rm*-CA and *Rm*-IA) are closer from the edge of the lagoon (at about 400 m) than the ones dominated by *C. tagal* (*Ct*-CA and *Ct*-IA) which are less subjected to tides (at about 500 m from the lagoon). The mean duration of immersion (calculated with the tidal model of the French Hydrographic and Oceanographic service of the Marine and the digital elevation model provided by the French Institute of Geographical Information Litto3D) is 1583 hours per year (4.3 hours per day) in the *R. mucronata* mangrove and 324 hours per year (53 minutes per day) in the *C. tagal* mangrove zone. The *C. tagal* mangrove zone is a shrubby mangrove, stressed by environmental gradients, where the mangrove trees have a weaker development than in continental mangroves and are characterized by a significant foliage yellowing (personal observations). The PW were mainly composed of organic matter, nitrogen and phosphorus nutrients, discharged in the mangrove areas with surface loading rates (respectively wet season / dry season, in g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>) of 3.26 / 4.14 for Chemical Oxygen Demand,

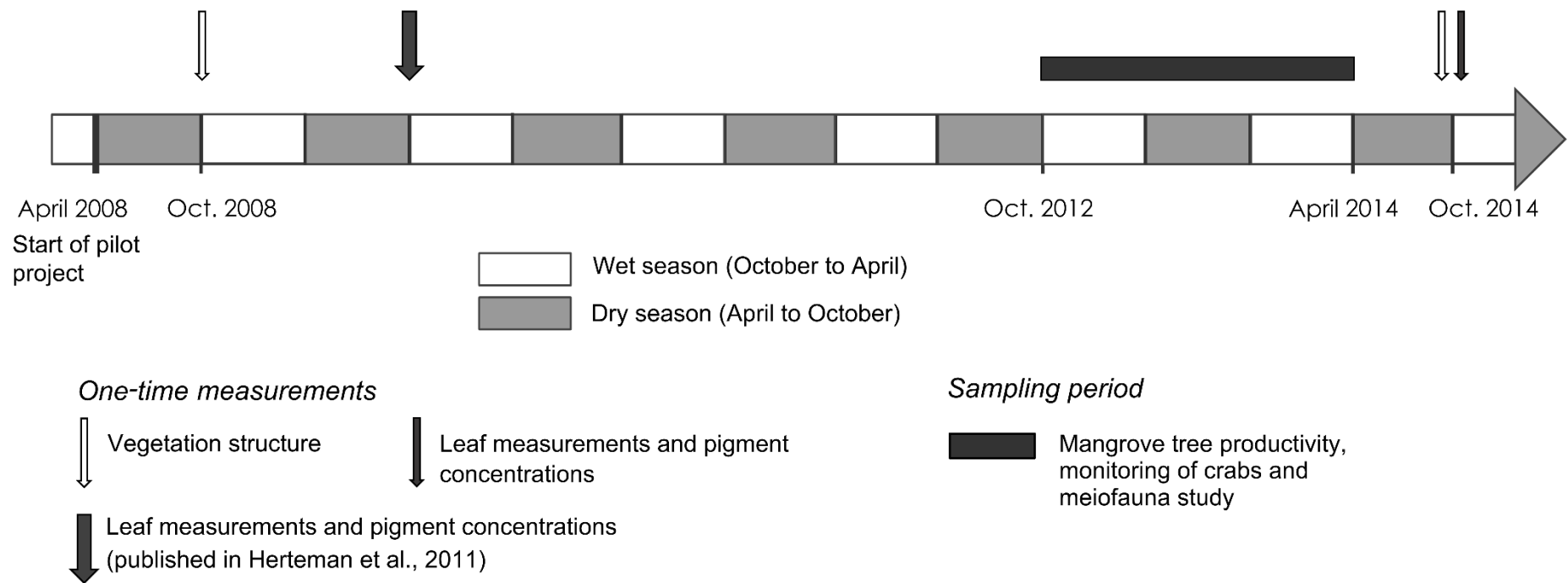
1.2 / 2.74 for Biological Oxygen Demand after 5 days, 1.17 / 1.27 for Suspended Solids, 0.44 / 0.71 for total Nitrogen and 0.093 / 0.173 for total Phosphorus (data obtained in 2013 and 2014 from SIEAM, Mayotte, France). The main physicochemical parameters of mangrove areas in sediment and porewater are summarized in Table 1. The sediments were sampled between the surface and 9 cm depth, and the porewater was sampled in piezometers placed in each mangrove area. The corresponding analysis were performed by the ARVAM laboratory (La Réunion, France) and by the physicochemical analysis platform (PAPC, EcoLab laboratory, France).

The long-term impact of PW supply was evaluated between October 2012 and October 2014, 4.5 to 6.5 years after the beginning of PW discharges, during the dry season (May-October) and the wet season (November-April), on three main compartments of the mangrove ecosystem: vegetation, crabs, and meiofauna (Figure 1). We have chosen to evaluate some parameter of the ecosystem (tree productivity, crab community and meiofauna) during a long period rather than at one date in order to integrate the variations linked for instance to meteorological events or to seasonal dynamics. The structure of the vegetation, which is less variable at a small temporal scale, was assessed at one date, after 6.5 years of PW discharges (in October 2014) and compared to data obtained after 6 months (in October 2008) in the same plots (short-term effect).

The plots used for the study of crab and meiofauna were positioned near the plots used for the study of the vegetation structure to avoid the consequences of soil trampling.

**Table 1.** Physicochemical parameters in water and sediment surface of control (CA) and impacted areas (IA) from *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones were measured in water (salinity and nutrient concentrations) from a piezometer for the wet season (March 2013) and the dry season (October 2013) and in sediment surface (C, N, P contents) for the wet season (March 2014) and the dry season (October 2014). N = 3 for all measurements except for P-measurement where n = 1, mean  $\pm$  SE.

		Light		Water					Sediment		
			( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	Salinity (psu)	$\text{NO}_3^-$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{NO}_2^-$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{NH}_4^+$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{PO}_4^{3-}$ ( $\mu\text{M}$ )	C (%)	N (%)	P (%)
Wet season	<i>Ceriops</i> mangrove zone	CA	214	$31.65 \pm 0.24$	$0.218 \pm 0.081$	$0.030 \pm 0.019$	$1.568 \pm 0.505$	$0.462 \pm 0.057$	$3.317 \pm 0.027$	$0.182 \pm 0.004$	0.453
		IA	46	$27.10 \pm 0.48$	$0.540 \pm 0.031$	$0.220 \pm 0.029$	$3.563 \pm 0.400$	$1.640 \pm 0.031$	$3.568 \pm 0.233$	$0.186 \pm 0.013$	0.385
	<i>Rhizophora</i> mangrove zone	CA	1486	$32.83 \pm 2.08$	$0.390 \pm 0.078$	$0.068 \pm 0.030$	$2.479 \pm 0.773$	$0.118 \pm 0.150$	$11.201 \pm 0.104$	$0.610 \pm 0.013$	0.291
		IA	556	$30.00 \pm 0.61$	$0.323 \pm 0.040$	$0.218 \pm 0.070$	$22.186 \pm 5.724$	$2.584 \pm 0.397$	$7.651 \pm 0.112$	$0.337 \pm 0.010$	0.342
Dry season	<i>Ceriops</i> mangrove zone	CA	90	$39.07 \pm 0.81$	$0.090 \pm 0.049$	$0.063 \pm 0.041$	$0.367 \pm 0.183$	$1.198 \pm 0.244$	$2.971 \pm 0.285$	$0.183 \pm 0.021$	0.370
		IA	72	$38.45 \pm 0.48$	$0.613 \pm 0.252$	$0.323 \pm 0.199$	$8.230 \pm 4.928$	$0.066 \pm 0.034$	$3.250 \pm 0.183$	$0.181 \pm 0.003$	0.433
	<i>Rhizophora</i> mangrove zone	CA	33	$36.85 \pm 0.66$	$0.165 \pm 0.039$	$0.085 \pm 0.005$	$0.966 \pm 0.355$	$0.500 \pm 0.075$	$8.270 \pm 0.227$	$0.412 \pm 0.002$	0.312
		IA	7	$35.25 \pm 0.64$	$0.958 \pm 0.520$	$2.838 \pm 0.485$	$128.762 \pm 31.699$	$5.731 \pm 1.504$	$8.506 \pm 0.265$	$0.503 \pm 0.006$	0.250



**Figure 1:** Organization of sampling during the study period.



## 2.2. Assessment of vegetation

### 2.2.1 Biomass and vegetation structure

The vegetation structure was determined on the same trees in October 2008 (Herteman, 2010; this study) and 2014, in each control and impacted areas, on 5 plots (2 m x 2 m) for *C. tagal* mangrove zone and 4 plots (5 m x 5 m) for *R. mucronata* mangrove zone. The size of the plots was adapted to the densities of trees. Mangrove trees species and their total abundance were assessed. Tree diameters at breast height (DBH) were measured at 1.3 m above the soil surface or 30 cm above the highest stilt root for *R. mucronata* (Kauffman and Donato, 2012). Owing to a high proportion of thin trees (especially *C. tagal* trees), DBH data were separated into two size classes:  $\leq 3$  cm or  $> 3$  cm. Tree heights and their standing live or dead status were determined. These results allowed to calculate the specific dominance, density and basal area of each tree species.

The growth rate of each mangrove tree was calculated from the difference of tree heights for two sampling campaigns ( $\Delta H = \text{Height}_{2014} - \text{Height}_{2008}$ ) divided by the number of years. For each year, each mangrove zone and each tree species, the difference of dead tree Relative Abundance ( $\Delta RA$ ) between the control and impacted areas was calculated at a given year as follows:  $\Delta RA = RA_{(\text{impacted in } 20XX)} - RA_{(\text{control in } 20XX)}$ .

Standing aboveground biomass (AGB) and belowground root biomass (BGB) of each tree were estimated from tree DBH data by using allometric equations specific to each tree species, as described by Nam et al. (2016). These equations required the wood density of each tree species, which have been obtained from the World Agroforestry Center Wood Density Database and Komiyama *et al.* (2005). The AGB consist of biomass of leaves, stems, trunks, twigs and aboveground roots, and the BGB is composed of belowground root biomass.

Regenerations, *i.e.* trees smaller than one meter, were counted only in October 2014. The relative abundance of regeneration was calculated from the total number of trees in all control and impacted areas.

### 2.2.2. Leaf measurements

On each impacted and control area in October 2014, 90 mature leaves of dominant mangrove tree species were randomly collected. Dry weights of leaves were obtained after desiccation in an air oven at 60°C during 3 days. Leaf areas were estimated from digital pictures of leaves using Image J software (version 1.48h3) after color adjustment and binarization of pictures. The

specific leaf area (SLA), *i.e.* the ratio between the leaf area and the leaf dry weight was then calculated.

### 2.2.3. Photosynthetic pigment analyses

On each area in October 2014, 12 mature leaves of the dominant mangrove tree species were randomly collected, kept in a cooler box during transport, and stored at -20°C until storage at -80°C at the laboratory. Pigments were extracted independently from 3 disks (Ø 16 mm) for each leaf. Disks were cut, crushed with 50 mg of Fontainebleau sand, and rinsed with 20 mL of methanol (Sigma-Aldrich, France). Around 20 mL of sample were transferred into a tube and placed in a ultrasound cold bath for 5 min. Mixtures were then placed at -20°C for 15 min and centrifuged at 4°C, 1700 g (High Conic Rotor, Thermo Scientific) for 5 min. One mL of supernatant was filtered on 0.2 µm PTFE membrane syringe filter (Ø 13 mm, VWR International, USA) and placed in a 2 mL-vial (Agilent Technologies). To prevent degradation of pigments, extractions were performed under dark conditions and samples stored on ice during handling. The extracts were stored a few days at -80°C before High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis with a 100 µL-loop auto-sampler and a quaternary solvent delivery system coupled to a diode array spectrophotometer (LC1200 series, Agilent technologies, USA). The mobile phase was prepared (solvent A: 70:30 (v/v) methanol:1M ammonium acetate and solvent B: 100 % methanol) and programmed (minutes; % solvent A; % solvent B): (0; 75; 25), (1; 50; 50), (20; 30; 70), (25; 0; 100), (32; 0; 100) according to the analytical gradient protocol described by Barlow et al. (1997). The column was then reconditioned to original conditions over a further 12 min. Pigment separation was performed through a C8, 3 µm-column (MOS-2 HYPERSIL, Thermo Scientific, USA). The diode array detector was set at 440 nm to detect carotenoids, at 665 nm for chlorophylls and pheopigments. Pigments were identified by comparing their retention time and absorption spectra with those of pure standard pigments (DHI LAB products, Denmark). Each pigment concentration was calculated by relating the peak area of its chromatogram with the corresponding area of calibrated standard using ChemStation software (version A.10.02, Agilent technologies). In parallel with extraction, one disk per leaf was dried and weighted in order to express the pigment concentration per dry weight unit.

### 2.3. Productivity of mangrove trees

On each mangrove area, 5 nets (1 m x 1 m) were randomly positioned (1.7 m above soil to avoid contact with high tides) in order to collect leaves, flowers and fruits from mangrove trees. Net contents were sampled every two weeks, separated according to plant parts and tree species and weighted after desiccation in an air oven. These litter measurements were carried out between October 2012 and March 2014. The mean value over time for each net was used for the analyses ( $n = 5$ ) to compare mangrove tree productivity between each area.

### 2.4. Monitoring of crabs

Between October 2012 and April 2014, once a month, the crab community was studied within the same 8 plots (1 m x 1 m) on each area with the method of visual counting as described by Nobbs and McGuinness (1999) and Skov et al. (2002). This method provides a better reproducibility regarding the natural constraints (season, tides) and is easily transposable to all vegetation mangrove zones. The total number of crabs and crab holes were counted to calculate their densities per square meters and the number of holes available per crab. The crab species were identified to determine the relative abundances of each species, and the mean diameters of crab hole were calculated. For all parameters, the mean value for each plot over the sampling period was used for the analyses ( $n = 8$ ).

### 2.5. Monitoring of meiofauna

#### 2.5.1. Sampling and extraction

Sampling of meiofauna was performed in October 2012, March 2014 and October 2014. On each area, in 4 plots, one sediment core per plot was carried with a syringe (50 mL) and divided into 2 subsamples, the surface layer (0-1 cm, 6.1 cm<sup>3</sup>) and the lower layer (1-4 cm, 18.4 cm<sup>3</sup>). These subsamples were fixed with a buffered formaldehyde solution (mineral water, NaCl 33 g.L<sup>-1</sup>) to reach a final concentration of 4 %. At the laboratory, samples were first sieved on a mesh of 1000  $\mu$ m to remove macrofauna. Then meiofauna and sediments were collected on a 30  $\mu$ m-sieve, rinsed to remove formaldehyde, and centrifuged 5 min at 1500 g. Supernatant was replaced by a solution of water and LUDOX (3:2 v/v, Sigma-Aldrich). Samples were centrifuged 5 min at 1500 g again to separate mineral components (pellet) and organic components such as meiofauna (supernatant). Then LUDOX was removed after rinsing on a 30

$\mu\text{m}$ -sieve, and organic components were collected and stored in a buffered 4 % formaldehyde solution. Sediment pellets were weighted after desiccation in an air oven.

### 2.5.2. Density and composition of meiofauna

To identify meiofauna individuals, samples were stained with erythrosine ( $8 \text{ g.L}^{-1}$ ) for 24 h. Individuals were then counted and identified at the lowest taxonomic level (Du et al., 2014) as possible with a x8-x100.8 binocular magnifier Leica MZ 12.5 equipped with a DFC 320 Leica camera. Nematoda, Copepoda (harpacticoid - adults and copepodids - and nauplii), Rotifera, Oligochaeta, Kinorhyncha, Foraminifera, Tanaidacea taxa have been listed. To obtain meiofaunal biomass, lengths and widths of 50 individuals per subsample or of the whole individuals per sample were measured from digital pictures using Image J software (version 1.48h3). Fresh weight of nematodes ( $W1$ ,  $\mu\text{g}$ ) was calculated by Andrassy's formula:  $W1 = (L \cdot D^2) / (1.6 \cdot 10^6)$  where  $L$  and  $D$  ( $\mu\text{m}$ ) are length and diameter of nematodes (Andrassy, 1956). Dry biomass of adult harpacticoid copepods ( $W2$ ) was estimated by Dumont's formula:  $W2 = 12.51 \cdot L^{4.40}$  where  $L$  is length between head and abdomen (mm) (Dumont et al., 1975), and for nauplii ( $W3$ ) by  $W3 = \exp(2.48 \cdot \ln(L) - 15.7)$  where  $L$  is length ( $\mu\text{m}$ ) (Giere, 2009). For oligochaetes, fresh weight ( $W4$ ) was estimated with  $W4 = \text{body density} \cdot \text{body volume} = 1.07 \cdot 3.14 \cdot r^2 \cdot L$  where  $r$  is width and  $L$  is length (mm). Total biomass by taxon ( $W_{\text{tot}}$ ) was obtained by  $W_{\text{tot}} = \text{individual biomass} \cdot \text{total individual number}$  (Giere, 2009). Abundances and biomass were divided by dry weight of sediment.

Trophic and morphotype groups of nematodes were described depending on feeding-types and mouthpart morphology according to previous studies which have shown correspondence between mouth area morphology and trophic group of nematodes according to Du et al. (2014), description based on Wieser (1953, 1959), Moens and Vincx (1997) and Traunspurger (1997). For *Ct*-IA and *Ct*-CA samples collected during dry seasons (October 2012 and 2014), fifty nematodes per sediment core were randomly chosen, mounted into glycerol and observed by microscopy using a Nikon Eclipse80 i microscope (x1000) equipped with a Nikon Digital Sight Ds-U3 camera and a priorScan III motorized stage. Mouth area measurements were made using NIS Element software.

### 2.6. Statistical analysis

Statistical analysis were performed using the PAST software (PAleontological STatistics, versions 2.17 and 3.06) (Hammer et al., 2001). When data have been collected at several dates

on the same plot (vegetation productivity and crab communities), the mean value for each plot was used for the analyses. For all analysis, the normality was checked on each dataset (vegetation structure, leaf and pigment measurements, and crab and meiofauna studies) with the Shapiro-Wilk test and data were transformed if needed. When data were normally distributed, two-way ANOVAs were used to test the effects of mangrove zone (*C. tagal* vs *R. mucronata*) and treatment (control vs impacted areas), followed by a Tukey post-hoc test. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used with Mann-Whitney test for pairwise comparisons of non-parametric data. Statistical differences between sampling campaigns (2008 and 2014 for vegetation structure parameters) were analyzed with one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test or by the non-parametric Kruskal-Wallis test with Mann-Whitney test for pairwise comparisons according to the type of distribution. The vegetation productivity in *Rm*-CA and *Rm*-IA was compared with t-test. Data given in the text are means  $\pm$  SE. For all statistical analyses, significance was inferred at  $p < 0.05$  (noted \* if  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ ).

### 3. Results

#### 3.1. Vegetation compartment

##### 3.1.1. Vegetation structure

The structure of vegetation was quite similar in both 2008 and 2014 campaigns (Table 2). In 2014, the *C. tagal* mangrove zone was largely dominated by the eponymous species which represented 97.02 % and 56.39 % of individuals in control (CA) and impacted (IA) areas, respectively. This mangrove zone was also composed of 2.61 % and 43.61 % of *R. mucronata* trees in CA and IA, respectively, and contained a few individuals of *Avicennia marina*. The *R. mucronata* mangrove zone was dominated by the eponymous species which represented 81.34 % and 73.61 % of individuals in CA and IA, respectively, followed by 15.31 % and 23.61 % of *C. tagal* species in CA and IA, respectively, and a few individuals of *Bruguiera gymnorhiza*. Total density in 2014 was very high in *Ct*-CA (87,500 ind.ha<sup>-1</sup>) and *Ct*-IA (25,000 ind.ha<sup>-1</sup>), and was 4 to 12 times lower in *Rm*-CA (6,300 ind.ha<sup>-1</sup>) and *Rm*-IA (4,200 ind.ha<sup>-1</sup>). A significant decrease of tree density was observed for *Rm*-IA in 2014 compared to the same area in 2008 ( $p = 0.0495$ ). A similar trend was observed for *Ct*-IA in 2014.

**Table 2.** Tree abundances and densities in control (CA) and impacted areas (IA) from *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones, 6 months (2008) and 6 years (2014) with PW supplies (n = 5 for *C. tagal* mangrove zone, n = 4 for *R. mucronata* mangrove zone, mean  $\pm$  SE) (RA = relative abundance). Significant differences (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis) are in bold with °  $p \leq 0.05$ , °°:  $p \leq 0.01$ , °°°:  $p \leq 0.001$  for differences between control and impacted areas and with \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$  for differences between 2008 and 2014.

		<i>Ceriops tagal</i> mangrove zone				<i>Rhizophora mucronata</i> mangrove zone			
		<i>C. tagal</i> trees		<i>R. mucronata</i> trees		<i>C. tagal</i> trees		<i>R. mucronata</i> trees	
		CA	IA	CA	IA	CA	IA	CA	IA
Specific dominance (%)	2008	97.16 $\pm$ 1.12	59.90 $\pm$ 18.02	2.46 $\pm$ 1.26	40.10 $\pm$ 18.02	21.91 $\pm$ 3.15	25.14 $\pm$ 6.65	74.96 $\pm$ 4.43	70.55 $\pm$ 4.43
	2014	97.02 $\pm$ 1.20	56.39 $\pm$ 18.64	2.61 $\pm$ 1.34	43.61 $\pm$ 18.64	15.31 $\pm$ 5.14	23.61 $\pm$ 5.73	81.34 $\pm$ 6.40	73.61 $\pm$ 7.65
Density (tree.ha <sup>-1</sup> )	2008	88000 $\pm$ 17092	27500 $\pm$ 16066	2000 $\pm$ 935	9500 $\pm$ 3984	1500 $\pm$ 191	1900 $\pm$ 551	5200 $\pm$ 516	5400 $\pm$ 841 *
	2014	85000 $\pm$ 16677	° <b>17000 <math>\pm</math> 9791</b>	2000 $\pm$ 935	8000 $\pm$ 3201	1000 $\pm$ 346	1000 $\pm$ 259	5100 $\pm$ 443	° <b>3100 <math>\pm</math> 412</b>
RA of dead individus (%)	2008	4.65 $\pm$ 1.93	21.04 $\pm$ 10.55	0.00	0.00	0.00	6.25 $\pm$ 6.25 **	3.74 $\pm$ 2.26	9.90 $\pm$ 4.33 **
	2014	5.54 $\pm$ 1.66	34.11 $\pm$ 15.37	0.00	2.50 $\pm$ 2.50	6.25 $\pm$ 6.25	° <b>47.62 <math>\pm</math> 5.05</b>	2.94 $\pm$ 2.94	° <b>45.00 <math>\pm</math> 4.57</b>
$\Delta$ RA of dead individuals	2008	16.39		0.00		6.25		6.15	
	2014	<b>28.57</b>		2.50		<b>41.37</b>		<b>42.06</b>	
RA of regeneration (%)	2014			0.36 $\pm$ 0.36	24.00 $\pm$ 11.22			19.64 $\pm$ 6.91	31.19 $\pm$ 10.86

The relative abundances of dead individuals and regenerations were measured for all zones (Table 2). In 2014, the RA of dead trees was significantly higher in *Rm*-IA than in *Rm*-CA for the major tree species. A similar trend was observed in *C. tagal* mangrove zone. Between 2008 and 2014, the RA of dead trees significantly increased (by 7.6 times for *R. mucronata* trees and by 4.5 times for *C. tagal* trees) in *Rm*-IA while it was stable elsewhere (Table 2). This mortality was observed for the smallest trees of both species, with average diameters of 5.97 cm and 7.08 cm for *C. tagal* and *R. mucronata* trees, respectively. The  $\Delta$ RA (*i.e.* the difference of RA between control and impacted areas at a given year) were 1.7 to 6.8 times significantly higher in 2014 than in 2008.

Only *R. mucronata* regenerations were found in both mangrove zones, mainly in areas where the density of *R. mucronata* trees was important. The RA of regenerations tended to increase with PW, but the differences were not significant.

Tree diameters at breast height, tree heights and tree basal areas are described in Table 3, along with standing aboveground biomass and belowground root biomass. DBH data were separated into two size classes:  $\leq 3$  cm (54.1 % of mangrove trees) or  $> 3$  cm (45.9 %). Only the dominant tree species of each mangrove zone were considered. In 2014, for all these structure parameters, significantly higher values were observed in IA compared to CA in both mangrove zones (Table 3). These differences were more marked in the *C. tagal* areas. Except for tree height, all the measured parameters were stable between 2008 and 2014 in control areas (Table 3). In contrast, they significantly increased in impacted areas, except the DBH superior to 3 cm. A growth rate was calculated using height data (Table 3). Results show a faster growth in impacted areas compared to control areas for both mangrove zones, with a significant difference for *C. tagal* areas where the growth rate was four times higher in IA than in CA.

**Table 3.** Measures of vegetation structure factors in control (CA) and impacted (IA) areas from *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones, 6 months (2008) and 6 years (2014) with PW supplies (n=5 for *C. tagal* mangrove zone, n=4 for *R. mucronata* mangrove zone, mean  $\pm$  SE). Measurements were made on the dominant species of each area. Significant differences (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis) are indicated with \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , in bold 2014 data significantly different from 2008 data.

		<i>Ceriops tagal</i> mangrove zone		<i>Rhizophora mucronata</i> mangrove zone	
		CA	IA	CA	IA
DBH $\leq$ 3 cm	2008	1.66 $\pm$ 0.04	1.58 $\pm$ 0.08		
	2014	1.73 $\pm$ 0.04	** 2.09 $\pm$ 0.12		
DBH > 3 cm	2008	3.88 $\pm$ 0.21	3.88 $\pm$ 0.12	11.70 $\pm$ 0.77	10.90 $\pm$ 0.86
	2014	3.96 $\pm$ 0.21	* 4.41 $\pm$ 0.27	12.16 $\pm$ 0.78	* 15.56 $\pm$ 1.23
Height (m)	2008	1.74 $\pm$ 0.04	1.66 $\pm$ 0.09	6.09 $\pm$ 0.41	6.74 $\pm$ 0.42
	2014	1.92 $\pm$ 0.04	*** 2.92 $\pm$ 0.14	6.49 $\pm$ 0.42	** 8.85 $\pm$ 0.63
Growth rate (cm.yr <sup>-1</sup> )	2008-2014	2.53 $\pm$ 0.24	* 10.16 $\pm$ 2.01	3.87 $\pm$ 1.73	6.62 $\pm$ 2.45
Basal area (m <sup>2</sup> .ha <sup>-1</sup> )	2008	0.96 $\pm$ 0.09	1.36 $\pm$ 0.17	5.26 $\pm$ 0.84	4.96 $\pm$ 0.77
	2014	1.01 $\pm$ 0.10	*** 2.19 $\pm$ 0.35	5.62 $\pm$ 0.85	* 8.99 $\pm$ 1.26
AGB (kg)	2008	1.52 $\pm$ 0.22	2.26 $\pm$ 0.34	66.45 $\pm$ 15.61	62.31 $\pm$ 11.91
	2014	1.60 $\pm$ 0.21	*** 4.00 $\pm$ 0.80	71.40 $\pm$ 15.21	* 123.52 $\pm$ 20.93
BGB (kg)	2008	0.95 $\pm$ 0.11	1.38 $\pm$ 0.19	6.58 $\pm$ 1.60	6.27 $\pm$ 1.22
	2014	1.00 $\pm$ 0.11	*** 2.32 $\pm$ 0.41	7.08 $\pm$ 1.56	* 12.47 $\pm$ 2.16
Leaf area (cm <sup>2</sup> )	2014	22.79 $\pm$ 0.63	*** 31.31 $\pm$ 1.23	76.45 $\pm$ 1.51	* 81.16 $\pm$ 1.85
SLA (cm <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	2014	43.82 $\pm$ 0.53	*** 57.86 $\pm$ 0.98	51.80 $\pm$ 0.69	*** 61.49 $\pm$ 0.65



### 3.1.2. Leaf response

The sizes of mature leaves were measured in all areas in 2014. It was significantly higher in impacted areas than in control area for both mangrove zones, as well as the specific leaf area. The latter increased by 32 % in *Ct*-IA ( $p < 0.0001$ ) and by 19 % in *Rm*-IA ( $p \leq 0.0001$ ) (Table 3).

### 3.1.3. Photosynthetic pigment analysis

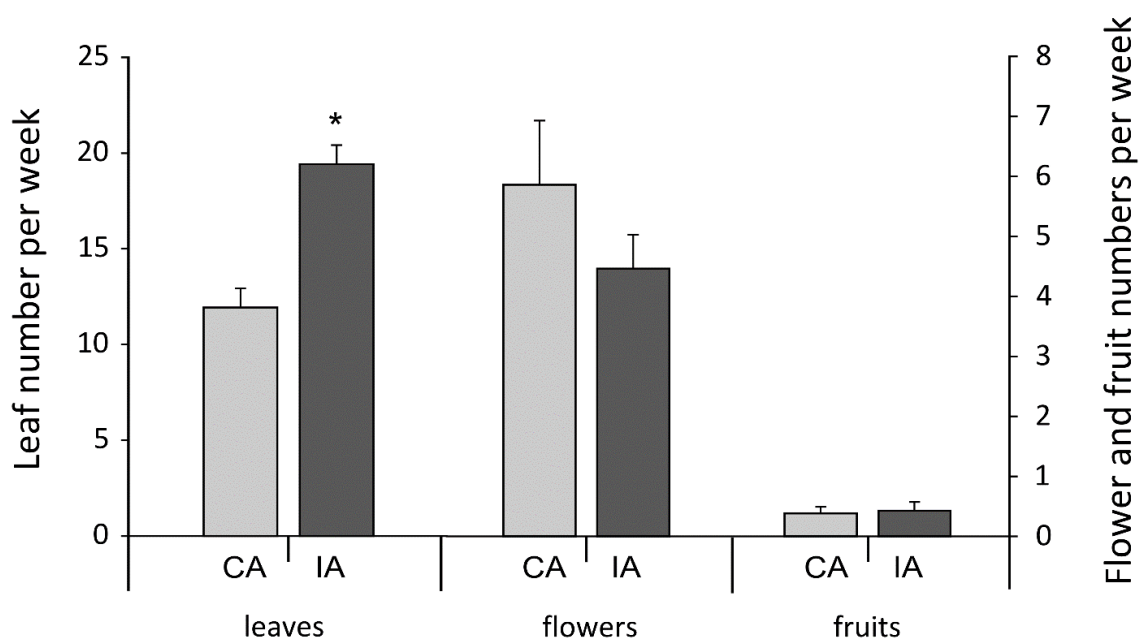
The influence of PW supplies on the photosynthetic pigments content of mature leaves from control and impacted areas was studied in 2014. Pigment composition was in mean 64 % of chlorophyll *a*, 22 % of chlorophyll *b*, 8 % of xanthophyll, 5 % of  $\beta$ -carotene and 1 % of phaeophytin *a*. The pigment concentrations were significantly higher in leaves from IA of both mangrove zones (Table 4); they were multiplied by three between *Ct*-CA and *Ct*-IA. In comparison, the increase was more moderate between *R. mucronata* areas. Several ratios have been used to estimate the pigment degradation and the response of mangrove trees to environmental changes (Table 4). The chlorophyll *a* : carotenoids and chlorophyll *a* : phaeophytin *a* ratios are negatively correlated to chlorophyll *a* degradation, high chlorophyll *b* : xanthophyll ratio is an indicator of nutrient oversupply in the environment, and a modification of the chlorophyll *a* : chlorophyll *b* ratio shows a tree adaptation to environmental changes. Significantly lower values of the chlorophyll *a* : chlorophyll *b* ratio were observed in impacted areas of both mangrove zones. In contrast, the chlorophyll *a* : carotenoids and the chlorophyll *b* : xanthophyll ratios were higher in *Ct*-IA compared to *Ct*-CA. The response of the chlorophyll *a* : phaeophytin *a* ratio differed according to the mangrove zone.

**Table 4.** Pigment content (mg.g<sup>-1</sup> dw) of *C. tagal* and *R. mucronata* leaves in control (CA) and impacted (IA) areas from *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones, respectively, in October 2014 (n=36, mean ± SE). Significant differences (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis) are in bold with \* p≤0.05, \*\*: p≤0.01, \*\*\*: p≤0.001 for differences between control and impacted areas.

	<i>Ceriops tagal</i> mangrove zone		<i>Rhizophora mucronata</i> mangrove zone	
	CA	IA	CA	IA
Chlorophyll <i>a</i>	0.990 ± 0.051	<b>3.646 ± 0.072 ***</b>	2.681 ± 0.098	<b>3.626 ± 0.094 ***</b>
Chlorophyll <i>b</i>	0.336 ± 0.022	<b>1.295 ± 0.029 ***</b>	0.908 ± 0.038	<b>1.258 ± 0.038 ***</b>
Xanthophyll	0.143 ± 0.006	<b>0.425 ± 0.007 ***</b>	0.334 ± 0.012	<b>0.469 ± 0.011 ***</b>
β-carotene	0.088 ± 0.004	<b>0.276 ± 0.006 ***</b>	0.210 ± 0.007	<b>0.269 ± 0.007 ***</b>
Phaeophytin <i>a</i>	0.012 ± 0.001	<b>0.048 ± 0.001 ***</b>	0.035 ± 0.001	<b>0.043 ± 0.001 ***</b>
Chl <i>a</i> :Chl <i>b</i>	3.032 ± 0.058	<b>2.826 ± 0.029 ***</b>	2.978 ± 0.024	<b>2.881 ± 0.012 *</b>
Chl <i>a</i> :Pheo <i>a</i>	81.479 ± 1.764	<b>76.428 ± 1.074 *</b>	76.868 ± 1.412	<b>84.980 ± 1.122 ***</b>
Chl <i>a</i> :Carotenoïde	4.202 ± 0.075	<b>5.188 ± 0.030 ***</b>	4.915 ± 0.028	4.910 ± 0.022
Chl <i>b</i> :Xanthophyll	2.297 ± 0.100	<b>3.037 ± 0.034 ***</b>	2.702 ± 0.032	2.684 ± 0.021

### 3.1.4. Vegetation productivity

For the assessment of dominant tree productivity in each mangrove zone, only the results obtained in the *R. mucronata* mangrove zone are shown (Figure 2). Indeed, there was a high proportion of *R. mucronata* trees in Ct-IA which did not allow a proper estimation of *C. tagal* trees productivity. In the impacted area of *R. mucronata* mangrove zone, a significant increase of leaf productivity was observed ( $p = 0.042$ ), with a mean number of leaves retrieved on the nets 1.6 times higher than in the control area. Besides, the influence of PW discharges on productivity of flowers was low, but it tended to be lower in impacted area compared to the control area (Figure 2).



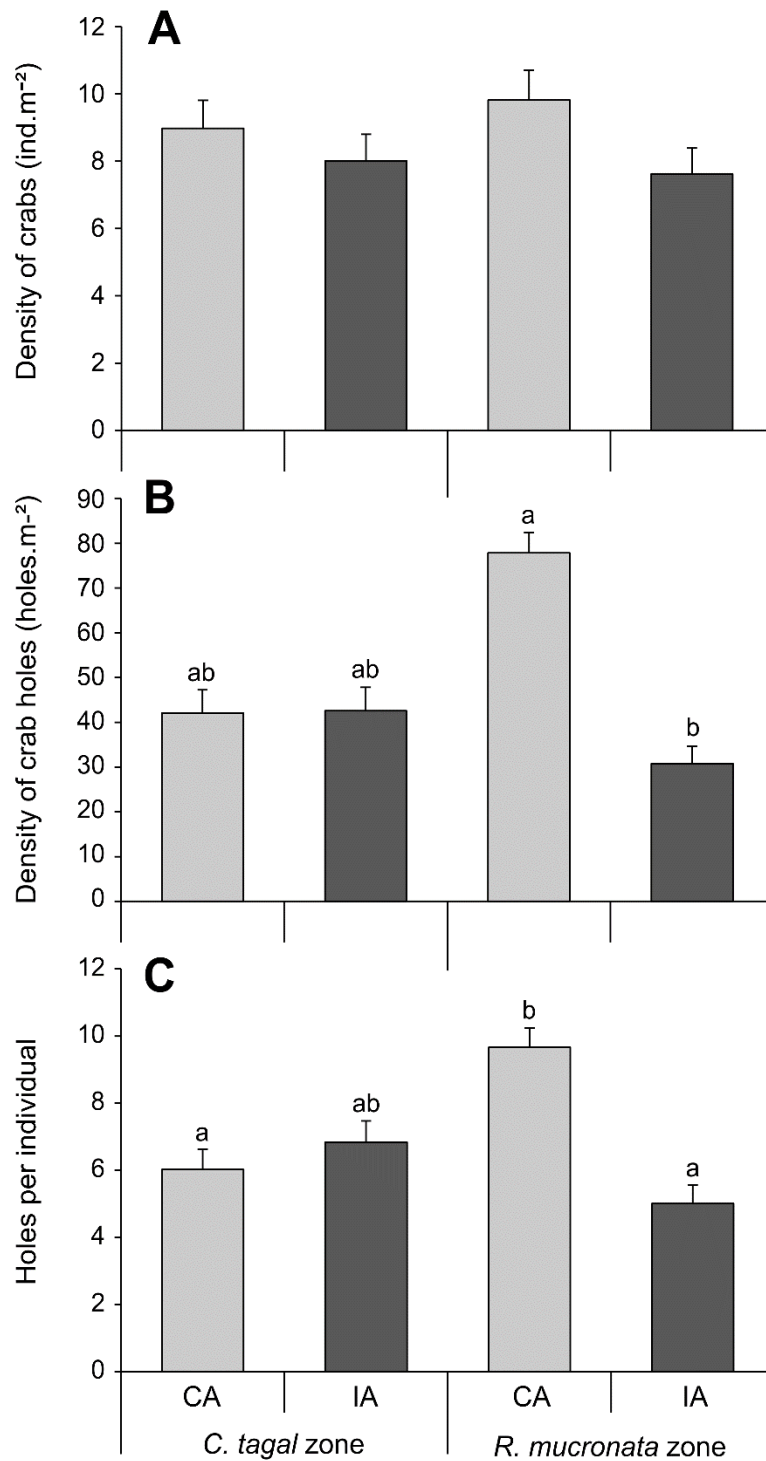
**Figure 2:** *R. mucronata* productivity measured in control (CA) and impacted (IA) areas from *R. mucronata* mangrove zone between October 2012 and March 2014. The mean values over time for each net were used for the analyses ( $n=5$ , mean  $\pm$  SE). Significant differences (t-test) between CA and IA are indicated with \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ .

## 3.2. Community of crabs

### 3.2.1. Densities of crabs and crab holes

The crab density,  $9.4 \pm 0.8$  individuals per  $m^2$  in control areas and  $7.8 \pm 0.5$  individuals per  $m^2$  in impacted areas, was not significantly influenced by PW discharges (Figure 3A). In contrast,

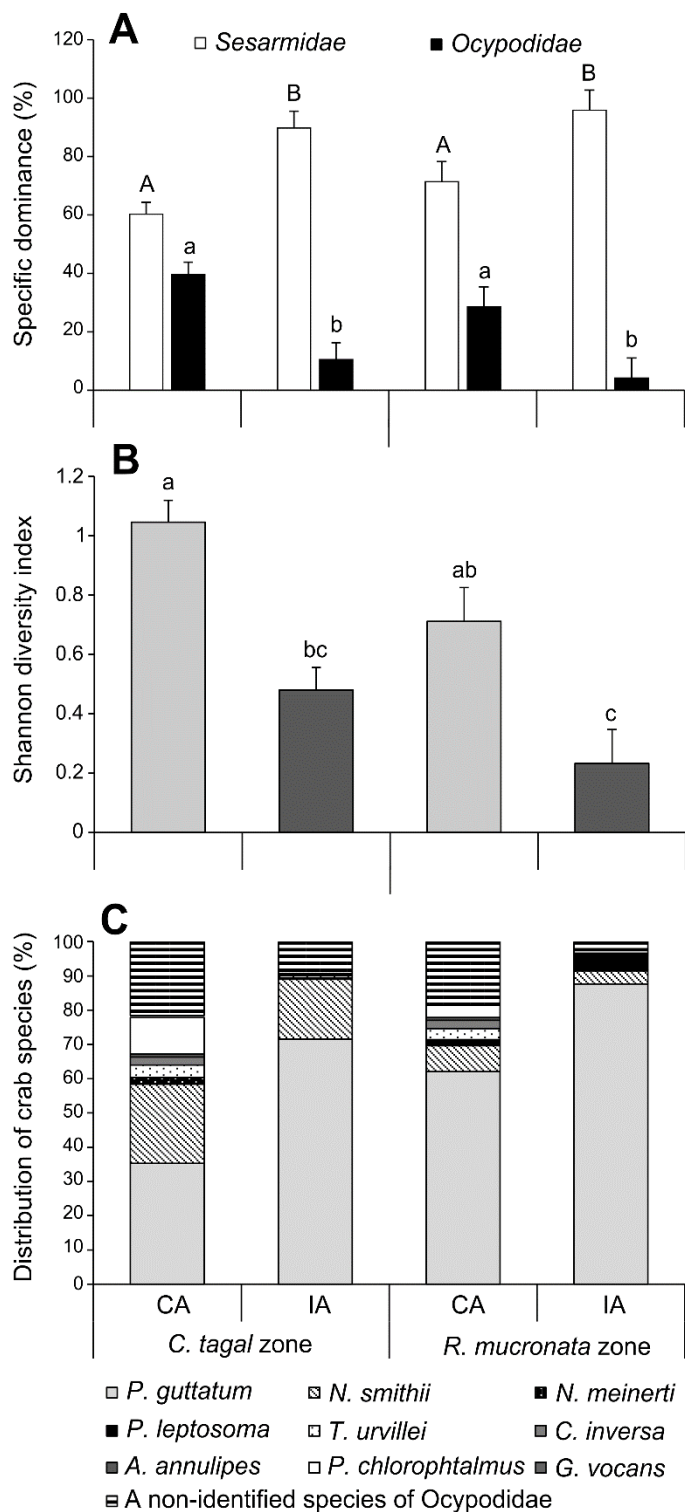
the density of crab holes varied among the experimental areas (Figure 3B). This density was significantly lower in *Rm*-IA ( $30.8 \pm 3.8$  holes.m<sup>-2</sup>) than in *Rm*-CA ( $77.8 \pm 4.5$  holes.m<sup>-2</sup>) ( $p = 0.005$ ) while it was identical in *C. tagal* areas. The number of holes available per individual was significantly higher in *Rm*-CA than in *Ct*-CA ( $p = 0.025$ ) and PW discharges induced a significant decrease of this number, only in *Rm*-IA compared to *Rm*-CA ( $p = 0.003$ ) (Figure 3C). The crab holes measured several millimeters to 8.9 cm of diameter with 60-70 % of holes included in the smallest class of size (0 - 0.9 cm of diameter) whatever the experimental area. The mean size of burrow tended to be smaller in impacted areas ( $1.03 \pm 0.05$  cm) compared to control areas ( $1.15 \pm 0.05$  cm) ( $p = 0.081$ ).



**Figure 3:** Crab densities (A), crab holes densities (B), and the number of holes per individual (C) were calculated in control (CA) and impacted (IA) areas from *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones between October 2012 and April 2014. The mean values over time for each plot were used for the analyses (n=8, mean  $\pm$  SE). Letters correspond to statistically homogeneous groups (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis).

### 3.2.2. Crab specific dominance and diversity

The crabs of Malamani mangrove belonged to two groups and 10 species: the Sesarmidae, feeding on leaves (*Perisesarma guttatum* (Milne-Edwards, 1869), *Neosarmatium smithii* (Milne-Edwards, 1853), *Neosarmatium meinerti* (De Mann, 1887) and *Parasesarma leptosoma* (Hilgendorf, 1869) and the Ocypodidae, detritivores (*Tubuca urvillei* (Milne Edwards, 1852), *Cranuca inversa* (Hoffmann, 1874), *Austruca annulipes* (Milne Edwards, 1837), *Paraleptuca chlorophthalmus* (Milne Edwards, 1837), *Gelasimus vocans* (Linnaeus, 1758) and another non-identified Ocypodidae. The Sesarmidae group was largely dominant, representing in average  $60.2 \pm 4.2$  % and  $71.4 \pm 6.8$  % of individuals in Ct-CA and Rm-CA, respectively (Figure 4A). This proportion was significantly higher in impacted areas of the two mangrove zones with  $89.7 \pm 5.8$  % and  $95.8 \pm 6.9$  % in Ct-IA and Rm-IA, respectively (Figure 4A). The  $\alpha$ -diversity of crabs, based on Shannon diversity index, was significantly reduced by the PW discharges in both mangrove zones ( $p = 0.0005$  for *C. tagal* zone,  $p = 0.003$  for *R. mucronata* zone) (Figure 4B). Ct-CA was dominated by three main species: *P. guttatum* ( $35.3 \pm 4.5$  % of individuals), *N. smithii* ( $23.1 \pm 4.4$  %) and a non-identified species of Ocypodidae ( $21.6 \pm 2.0$  %) whereas Rm-CA mainly contained *P. guttatum* ( $62.0 \pm 7.9$  %) and the non-identified species of Ocypodidae ( $18.5 \pm 5.0$  %) (Figure 4C). PW discharges induced a stronger dominance of *P. guttatum* in impacted areas, its proportions reaching  $71.5 \pm 7.2$  % and  $87.6 \pm 2.5$  % of individuals in *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones, respectively. This was accompanied by a decrease of almost all species observed in impacted areas, and a complete disappearance of *G. vocans* and *P. leptosoma* in Ct-IA and *A. annulipes* in Rm-IA.



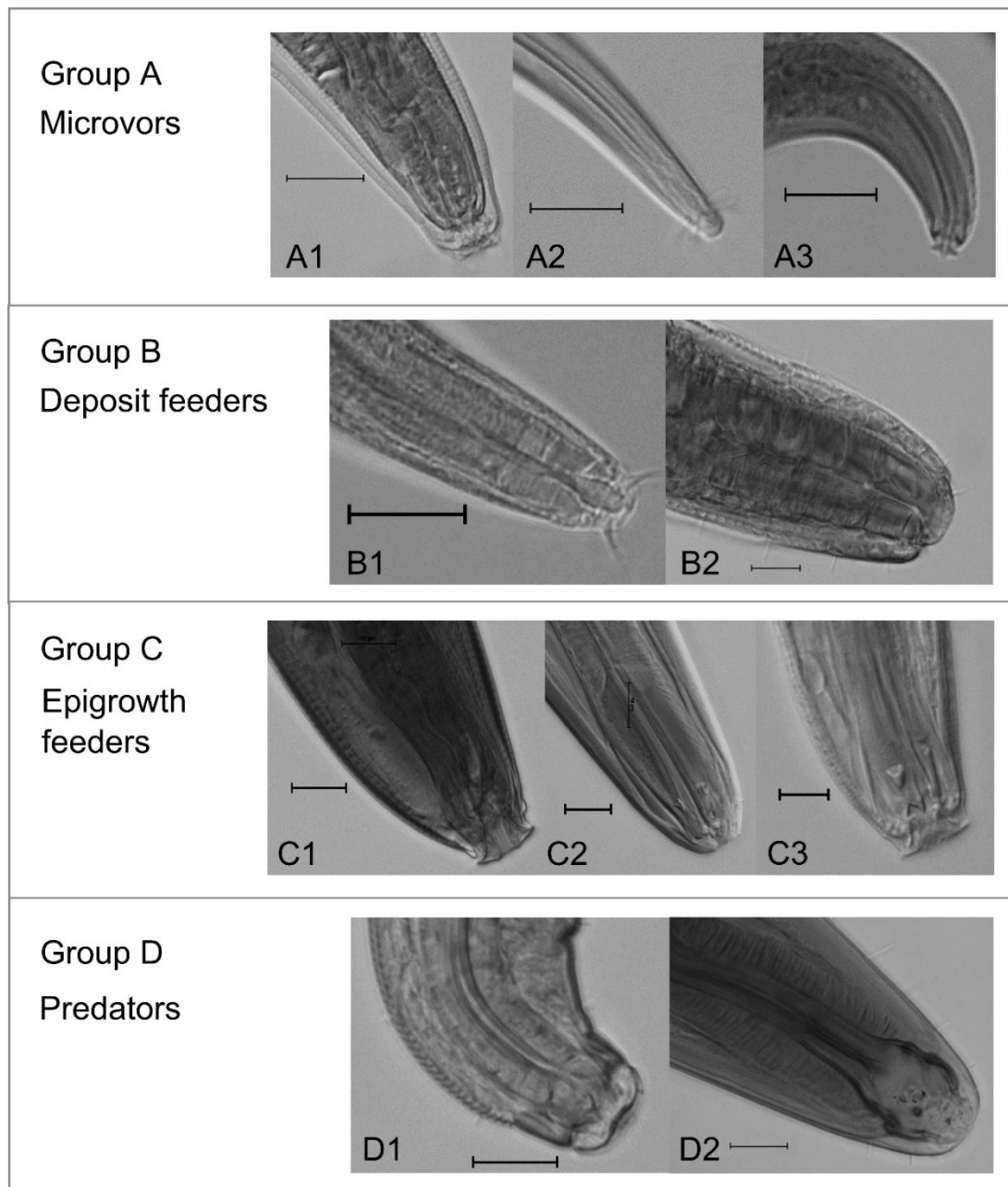
**Figure 4:** Sesarmidae / Ocypodidae proportions (A), Shannon diversity index (B) and crab species distribution were evaluated between control (CA) and impacted (IA) areas from *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones between October 2012 and April 2014. The mean values over time for each plot were used for the analyses (n=8, mean  $\pm$  SE). Letters correspond to statistically homogeneous groups (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis).

### 3.3.Meiofauna study

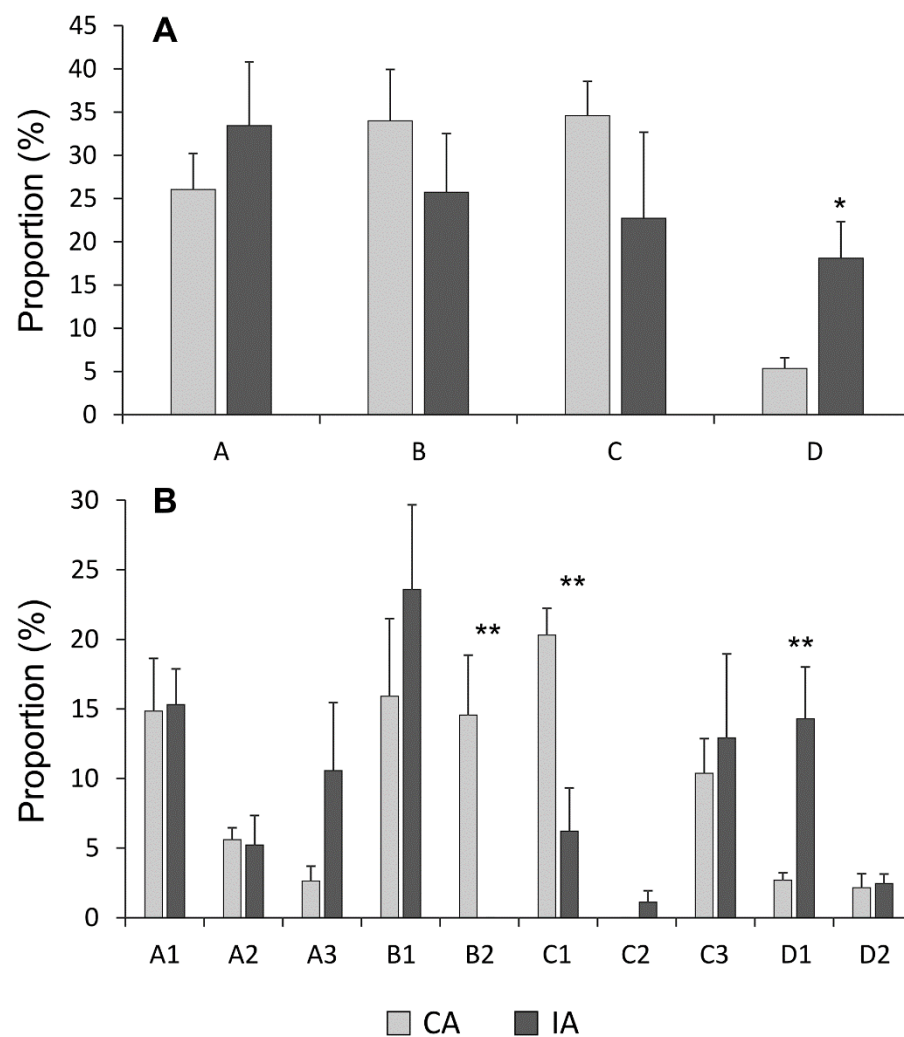
Meiofauna samples were collected in all areas in October 2012, March 2014 and October 2014. 95 % of meiofauna was found in the 0-1 cm layer, so that the results of the lower layer analyses are not given here. Meiofauna was mainly composed by nematodes ( $74.3 \pm 2.0$  % in abundance,  $172 \pm 25$  ind.g<sup>-1</sup> dry sediment,  $48.9 \pm 9.2$  µg.g<sup>-1</sup> dry sediment) and copepods ( $13.5 \pm 1.3$  % in abundance,  $34 \pm 6$  ind.g<sup>-1</sup> dry sediment,  $18.5 \pm 4.5$  µg.g<sup>-1</sup> dry sediment). Less abundant taxa ( $12.2 \pm 1.5$  %) were Foraminifera ( $7.7 \pm 1.3$  ind.g<sup>-1</sup> dry sediment), Kinorhyncha ( $3.6 \pm 0.9$  ind.g<sup>-1</sup> dry sediment), Tanaidacea ( $2.5 \pm 3.7$  ind.g<sup>-1</sup> dry sediment) and Rotifera ( $2.1 \pm 0.7$  ind.g<sup>-1</sup> dry sediment). PW discharges had no effect on the total abundance and biomass of meiofauna but it induced a significant decrease of the abundance of Kinorhyncha ( $p = 0.014$ ) and Tanaidacea ( $p = 0.0004$ ) for *Ct*-IA compared to *Ct*-CA, and an only decrease of Tanaidacea ( $p = 0.02$ ) for *Rm*-IA compared to *Rm*-CA.

Since it appeared from these results that the impact of PW supply on meiofauna community was stronger in *C. tagal* mangrove zone than in *R. mucronata* mangrove zone, a further attention was given to the nematodes, the major taxa, in samples from the first zone. No significant difference between *Ct*-IA and *Ct*-CA was observed on nematodes density and biomass. Nevertheless, the composition in trophic groups and morphotypes seemed different. Four trophic groups were observed: the microvores (A) with or without a buccal cavity, the deposit feeders (B) with a buccal cavity but lacking dentition, the epigrowth feeders (C) with small teeth and/or denticles in a buccal cavity, and the predators (D) with powerful teeth or mandibles (Figure 5). The group of ciliate feeders, with a buccal cavity but lacking dentition, was not represented in the samples of this study. The main food sources of these nematodes are bacteria (for all trophic groups), ciliates (for B and some of D), cyanobacteria, microalgae and diatoms (for B and C), detritus, nematodes and oligochaetes (only for D). Each trophic group was further divided into two or three morphotypes based on the buccal area morphology of nematodes (Figure 5). In sediment samples from *Ct*-IA, the proportion of predators was 3-times higher compared to those from *Ct*-CA ( $p = 0.016$ ) (Figure 6A). This difference was mainly linked to the increase of the morphotype D1 ( $p = 0.0050$ ) (Figure 6B). In contrast, in *Ct*-IA the deposit feeder morphotype B2 was not present ( $p = 0.0028$ ) and the proportion of epigrowth feeder morphotype C1 was significantly reduced by three ( $p = 0.0033$ ).





**Figure 5:** Classification of the nematodes encounter in *C. tagal* mangrove zone in October 2012 and 2014 into 4 trophic groups and 10 morphotypes after their feeding-type and mouthpart. Scale: 10  $\mu$ m.



**Figure 6:** Trophic groups (A) and morphotypes (B) of nematodes identified in control (CA) and impacted (IA) areas of *C. tagal* mangrove zone in October 2012 and 2014, group A: microvivors, group B: deposit feeders, group C: epigrowth feeders and group D: predators (n=4, mean  $\pm$  SE). Significant differences between control and impacted areas (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis) are indicated with \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ . For morphotype legends (A1, A2, A3, B1, B2, C1, C2, C3, D1, D2) see Figure 5.

## 4. Discussion

### 4.1. Vegetation

At the beginning of the experiment, and throughout the experiment in control areas, the insular mangrove certainly suffered from nutrient deficiency and salinity stress. This is notably suggested by the fact that the average of tree heights, though close to those of similar insular mangroves in Japan and Sri-Lanka, and to those of young or dwarf continental mangroves in

Kenya, French Guiana and Mexico, is lower than most of the continental mangroves of Pacific, Australia, Atlantic and Africa (Komiyama et al., 2008; Agraz Hernandez et al., 2011). This stressed status explains the strong potential of vegetation renewal and growth, as revealed in the areas of *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones exposed to the PW discharges. Indeed, the analysis of growth parameters showed an increase of all parameter values (DBH, height, basal area, biomass, leaf area, vegetation productivity) in IA compared to CA for both mangrove zones in 2014. The effect of PW discharges were more marked on the vegetation growth in *C. tagal* mangrove zone and *R. mucronata* mangrove zone. A comparable development of the canopy was described in other studies, for example as a consequence of *in situ* P and/or N inputs (Lovelock et al., 2004; Martin et al., 2010) or a 6-month pretreated wastewater discharge in a constructed mangrove (Wu et al., 2008).

The vegetation growth was accompanied by an increase of all the pigment concentrations of leaves in IA of both mangrove zones in 2014, which indicates an increase of photosynthetic activity (Das et al., 2002). Pigment compositions were similar after 6.5 years of PW discharges than after one year of PW discharges (Herteman et al., 2011) while the pigment concentrations were slightly higher. Besides, a higher increase in pigment concentrations was observed in *Ct*-IA compared to *Rm*-IA (see table 4). Clough et al. (1997) and Clough (1998) indicated that the photosynthetic activity would be lower in mangrove areas subjected to higher aridity and salinity conditions. In the areas exposed to the PW discharges, the salinity decreased (see table 1), which may partly explain the increase in pigment concentrations observed in impacted areas. The chlorophyll *a* : phaeophytin *a* ratio was lower in the *Ct*-IA indicating that leaves had a higher degradation state in the IA compared to the CA. In contrast, this was not observed in the *R. mucronata* mangrove zone. The modifications of several pigment ratios highlighted the environmental changes linked to PW discharges. For instance, the chlorophyll *a* : chlorophyll *b* ratio, which is negatively correlated with the N-stock in sediment and positively correlated with light intensity under the canopy (Kitajima and Hogan, 2003), decreased in areas exposed to PW. An increase in pigment concentrations may be explained as a reaction to chemical stress. It is hypothesized that pigment concentrations increase to sustain energy requirements. For example, it is thought that chlorophyll *b* concentration increases to enlarge the wavelength range that can be harvested (Negri et al., 2015). Moreover, the chlorophyll *b* : xanthophyll ratio, which is an indicator of nutrient excess in environment (MacFarlane and Burchett, 2001), increased in IA, in response to nutrient input. The comparison of leaf areas measured in 2014 (this study) to those measured in 2009 (Herteman et al., 2011) suggests an attenuation of the

differences observed between leaves from control and impacted areas. This attenuation was a consequence of an increase of the means for CA and a stagnancy of the means for IA between 2009 and 2014. After 6.5 years of discharges, the influence of PW could have reached a limit of impact for the leaves, both in terms of pigment content and surface.

Over the study period, a decrease of tree density associated with an increase of tree mortality was observed in IA compared to CA (see table 2). This phenomenon was essentially observed in *R. mucronata* mangrove zone. First, this may be explained by the increase of mangrove tree growth which produces a thicker canopy limiting the light arrival for the smaller individuals (see Table 1), potentially leading to their death. This is partly contradictory with Lovelock et al. (2009) who did observe tree mortality as a response to a long-term N-enrichment, but essentially in mangroves exposed to high salinity and aridity. Tree mortality should therefore have been more important in the *C. tagal* mangrove zone, which better fulfill these criteria than the *R. mucronata* mangrove zone. Moreover, the strongest increase in growth was observed in *C. tagal* trees. Another possible explanation for this additional mortality in *R. mucronata* mangrove zone may be the increased length of immersion associated with PW discharges, in a zone where the immersion duration is already longer than in *C. tagal* mangrove zone. This may have resulted in a more anoxic substrate, limiting air penetration within the sediment. This anoxia may be responsible for trees mortality. However, the PW discharge each day for one hour was equivalent to a rainfall event of 14.8 mm. The impact of PW in terms of immersion duration was therefore likely limited. Nevertheless, an increase of the microbial activity induced by the nutrient input may have contributed to the anoxia of the sediment. Unfortunately, no measurement of the oxygen concentration in the sediment has been done. Finally, the mortality of trees may be directly linked to the nutrient enrichment which may stimulate the growth of the shoots at the expense of the roots, and make mangrove trees more vulnerable to wind and waves (Lovelock et al., 2009). The nutrient-stressed status of Malamani mangrove may also cause a delay in tree mortality increase, which would require a longer monitoring to observe the expected effects.

#### 4.2. Crab community

Given the essential role of crab in the mangrove ecosystem, a negative impact on them and a loss of their function would be dramatic for mangrove functioning (Cannicci et al., 2008; Lee, 2008). The distribution of crab species in mangrove is known to be influenced by many factors

as relative humidity, temperature, grain size and porosity of sediments, salinity gradient and mangrove tree species (Steinke et al., 1993; Frusher et al., 1994). The Ocypodidae and the Sesarmidae identified in this study are two groups of mangrove crabs which usually dominate the mangrove forests (Kristensen, 2008). Our results showed no influence of PW discharges on crab density but a decrease of crab diversity. This suggests that some species took advantage of the fall of other species. A similar modification of the crab distribution and a decrease in species richness was observed in an Australian mangrove submitted to gradient of treated wastewaters (Wear and Tanner, 2007). Adverse effects were also observed on mangrove crabs such as a decrease of survival in sewage-exposed mangrove mesocosm in a Tanzania mangrove (Penha-Lopes et al., 2009). However, an enhanced diversity of Ocypodidae and Sesarmidae crabs was observed in response to wastewaters in peri-urban mangroves of Kenya and Mozambique (Cannicci et al., 2009) and in an urban mangrove in Thailand (Wickramasinghe et al., 2009).

In the present study, the response of crab community in the mangrove areas exposed to PW may be either directly linked to PW (decrease in salinity, presence of micropollutants) or indirectly through modifications of the environment (modification of food sources, decrease in oxygen concentration in the sediment) associated with the increase of vegetation growth (less light under the canopy, lower temperature, more litter). One of the main consequences of PW discharges was a significant increase in the proportion of Sesarmidae in the impacted areas (see figure 4A). These crabs feeding on leaves, this may be explained by an increase of available food linked to enhanced leaf productivity in presence of PW, at least in *Rm*-IA (see figure 2). No mortality of crabs was observed in IA (personal observation) in contrast to what has been observed on crab exposed to wastewaters in mesocosm (Penha-Lopes et al., 2009). The effect was more pronounced in *R. mucronata* mangrove zone than in *C. tagal* mangrove zone. The decrease of Ocypodidae proportion and the disappearance of some species (e.g. *Austruca annulipes* or *Gelasimus vocans*) may be the result of population movements, either to flee the excess of nutrients and freshwater or to forage. These species are known to have a preference for open areas (Nobbs and McGuinness, 1999). To dig their burrow, they select the better place to find their food source, *i.e.* particular matter or algal biofilm (Litulo, 2005). They may have avoided the impacted areas because of the canopy closure which should reduce algal biofilm growth. On the opposite, *Perisesarma guttatum* and *Parasesarma leptosoma*, known to have a preference for shaded areas (Lee, 1998), progressively dominated in impacted areas where the canopy closure is more important.

Another parameter critical for crab distribution is salinity. In the present study, variations in crab distribution were not correlated with the seasons (data not shown), while salinity strongly fluctuates between the seasons (Herteman, 2010). Moreover, species known to be sensitive to high concentrations of salt (*Neosarmatium smithii*, Gillikin and Schubart, 2004) were more represented in the *C. tagal* mangrove zone, where the salt concentrations were the strongest. On the contrary the *Neosarmatium meinerti* and *Cranuca inversa*, halotolerant species (Eshky et al., 1996), were more represented in Rm-IA. Therefore, the modification of crab communities was unlikely linked to the freshwater input associated with PW discharges.

The model defined by Pearson and Rosenberg (1978), predicting that the small species like Ocypodidae should dominate the mangrove areas enriched by organic matter to the detriment of the taller species, is not confirmed in the present study. The PW discharges promoted the development of Sesarmidae, crabs bigger than the Ocypodidae. With no difference in crab density, this should lead to an increase of crab biomass in mangrove areas receiving PW, as observed by Cannicci et al. (2009) in a study of peri-urban mangrove submitted to diffuse pollution. However, the diameter of crab hole did not increase with PW discharge. This diameter being correlated to the individual size (Warren, 1990), this does not indicate any variation in crab size and therefore in crab biomass. These results also suggest a lower size of Sesarmidae in impacted areas, maybe an indication of a worse physiological status. This may have a significant effect on the crab bioturbation activity. Moreover, Bartolini et al. (2009) studied the behavior of two fiddler crab species (*A. annulipes* and *G. vocans*) in a mangrove mesocosm exposed to controlled seawater and sewage mixtures and showed that the PW discharge could modify the crab behavior. The crabs exposed to wastewaters seem to satisfy their feeding demand faster and decreased their bioturbation activity in favor of territorial defense and courtship activity.

The ecotoxicological effects of PW on crab from Malamani are currently studied by the University of Mayotte. Supplementary works could be set up to evaluate the crab distribution outside the studied mangrove areas, in order to better evaluate the movements of populations.

An extension of the disturbance may possibly lead to a decrease in crab density, which may then induce a collapse of the ecosystem. Indeed, the absence of crab in mangroves would induce an increase of sulfur concentration, a modification of nutrient concentration, an important hypoxia of sediment and finally a decrease of vegetation growth and productivity (Kristensen et al., 1988; Smith et al., 1991).

### 4.3. Meiofauna community

The composition of meiofauna in Malamani was close from those observed in other mangroves, for example in Brazil (Silva-Camacho et al., 2017), New Caledonia (Debenay et al., 2015) or Vietnam (Mokievsky et al., 2011). In the present study, the PW discharges did not affect the total abundance and biomass of meiofauna. This was unexpected because meiofauna is supposed to be particularly sensitive to environmental changes and to pollutant supplies (Giere, 2009). These organisms are notably influenced by the sediment granulometry and oxygenation, the salinity and by the amount of particular organic matter (POM) (see review by Nagelkerken et al., 2008). For instance, Della Patrona et al. (2016) observed an increase of total meiofauna abundance and biomass in a mangrove zone receiving shrimp farm effluents. In our experiment, the increase of leaf litter production, as seen in *Rm*-IA (see Figure 2), should have induced an increase in POM in sediments, as the result of leaf degradation (Zhou, 2001). Similarly, the input of organic nutrients might induce higher bacterial densities, as shown by Bouchez et al. (2013) in a previous experiment in Malamani. All this should have favored meiofauna productivity by increasing availability of some of their trophic resources (*i.e.* bacteria and detritic organic matter). In contrast, the vegetation growth, associated with a thicker canopy, may have limited microalgal growth, representing another food source for meiofauna. These opposed phenomena may explain the similar densities observed in CA and IA samples.

Some rare taxa like Tanaidacea and Kinorhyncha were negatively impacted by PW discharges. This is consistent with the results of Della Patrona et al. (2016) who noted an extreme sensitivity of one rare taxa (Halacaroidea) to shrimp farm effluents. Similar results have been obtained for meiofaunal communities (*e.g.* Kinorhyncha, Tanaidacea and Tardigrada) exposed to fish farm effluents in marine sediments (Mirto et al., 2010). The disappearance of these particular taxa was certainly linked to their high sensitivity to anoxia (Ambrosio et al., 2014; Sutherland et al., 2007) which is more frequent in presence of high concentrations of organic matter from effluents or PW. These taxa may be good indicators of anthropic pollution.

Although there was no difference in terms of nematodes abundance and biomass, the proportions of trophic groups and morphotypes were different in *C. tagal* areas (see Figure 6). Compared to the *Ct*-CA, the *Ct*-IA nematode community comprised a higher percentage of the predators D1, and a lower proportion of the epigrowth feeders C1, while the deposit feeders B2 were absent. The B2 morphotype are larger deposit feeders with a more spacious buccal orifice than the B1 group. According to Wieser (1953) and Moens et al. (2006), the former likely

corresponds to non-selective feeders (*i.e.* potentially feeding on bacteria and larger-sized microalgae and protozoan) whereas the latter mainly comprises bacterial feeders (*i.e.* their small buccal cavity allows only particles in the size of bacteria to be ingested). This is consistent with the idea of a higher bacterial biomass linked to the nutrient input in the impacted areas. Moreover, the epigrowth feeders C1, equipped with a sclerified buccal structure allowing to scrap off particles from microbial biofilms (Moens et al., 2006) was less present in IA. Therefore, these results show that two potential microalgal/protozoan feeder groups (B2 and C1 morphotypes) were less represented while bacterial feeders were favored (B1 morphotype) in the area submitted to the PW discharges. This is consistent with a possible limitation of the microalgal growth in IA as suggested above. The nematode community was thus less diversified in term of trophic morphotypes in the IA than in the CA of the *C. tagal* mangrove zone. It is known that some of predator nematodes can feed on both preys and detritus (Du et al., 2014; Wieser, 1953). It is therefore likely that the higher proportion of a fraction of the predators (morphotype D1) in the *Ct*-IA corresponded to these potential detritus feeders resulting from the input of detritic organic matter in the impacted area. Due to their trophic diversity, nematodes participate to all the pathways of energy transfer of microbial carbon to higher trophic levels in benthic food webs (Carpentier et al., 2014; Du et al., 2014; Schmid-Araya and Schmid, 2000), a decrease of this diversity could therefore modify the trophic functioning of such ecosystem.

## 5. Conclusion

We showed here that a several-year input of freshwater and nutrients in a nutrient-stressed insular mangrove did not induce major dysfunction of the ecosystem. The excess of nutrients and freshwater input led to an increase of vegetation growth and productivity as well as some modifications of crab and meiofauna community structure. The evolution of the benthos may be linked to a modification of the food sources, to the salinity gradient and to a decrease of oxygen in sediments associated to length of immersion by tides. The main results of our study show no effect on crab and meiofauna abundance but they highlight an effect on crab and meiofauna diversity with an increase of the Sesarmidae to the detriment of the Ocypodidae for the crab community and a modification of the rare taxa and the trophic group of nematodes for the meiofauna community. A dysfunction in the crab community could induce a total dysfunction of the mangrove ecosystem. As a whole, our results suggest that in an insular



context natural mangrove can be used for pretreated wastewaters release but for a limited time to avoid crossing a threshold leading to ecosystem collapse. The mangrove zone dominated by *C. tagal* seems more suitable for this application than the one dominated by *R. mucronata*, notably because of its lower tree mortality and lower effect on crab holes density. It can be noted that the *C. tagal* impacted and control areas were slightly different at the beginning of the experimentation, in terms of vegetation structure (see table 2). Notably, some *R. mucronata* trees were present in the impacted area. This may have influenced the response of the ecosystem to the PW discharges. To avoid this bias for the study of the vegetation, we focused on the dominant trees in each zone. Concerning fauna, the impact of the presence of these trees was likely low because (i) there was no or very few significant differences between *C. tagal* and *R. mucronata* control areas in terms of crab communities and (ii) *C. tagal* and *R. mucronata* impacted areas responded differently to the PW discharges. For an operational usage of this ecosystem service from mangrove, more information is needed concerning the ability of the ecosystem to recover after such a perturbation and the thresholds leading to major dysfunction of the ecosystem. Notably, the specificities of each site and each mangrove zone should be carefully taken into account.

## 6. Acknowledgements

We are grateful to the Water Syndicate of Mayotte (SIEAM) for the maintenance of the experimental system, the coastal conservatory of Mayotte for the study site, the French National Research Center (CNRS) through the Ecological Engineering (2007-2008), the ARVAM laboratory (La Réunion, France) for the water geochemical analysis from piezometers, Frédéric Julien from physicochemical analysis platform (EcoLab laboratory, France) for sediment analysis and Eliott Sucre from University center of Mayotte for his researches on crabs of Mayotte.

## 7. Funding sources

This work was supported by the Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA) and by the PEPS mangrove (CNRS, 2015).

## 8. References

- Aburto-Oropeza, O., Ezcurra, E., Danemann, G., Valdez, V., Murray, J., Sala, E., 2008. Mangroves in the Gulf of California increase fishery yields. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 10456–10459. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804601105>
- Agraz Hernandez, C.M., Garcia Zaragoza, C., Iriarte-Vivar, S., Flores-Verdugo, F.J., Moreno Casasola, P., 2011. Forest structure, productivity and species phenology of mangroves in the La Mancha lagoon in the Atlantic coast of Mexico. *Wetl. Ecol. Manag.* 19, 273–293. <https://doi.org/10.1007/s11273-011-9216-4>
- Alongi, D.M., 2008. Mangrove forests: Resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate change. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 76, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.08.024>
- Ambrosio, E.S., Ferreira, A.C., Capítulo, A.R., 2014. The potential use of *Sinelobus stanfordi* (Richardson, 1901)(Crustacea, Tanaidacea) as a biological indicator of water quality in a temperate estuary of South America. *Limnetica* 33, 139–152.
- Andrassy, 1956. The determination of volume and weight of nematodes. *Acta Zool. Acad. Sci. Hungaricae* 1–15.
- Ball, M., 1998. Mangrove species richness in relation to salinity and waterlogging: a case study along the Adelaide River floodplain, Northern Australia. *Glob. Ecol. Biogeogr. Lett.* 7, 73–82. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.1998.00282.x>
- Banci, K.R. da S., Mori, G.M., Oliveira, M.A., Pganelli, F.L., Pereira, M.R., Pinheiro, M.A.A., 2017. Can environmental pollution by metals change genetic diversity? *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) as a study case in Southeastern Brazilian mangroves. *Mar. Pollut. Bull.* Article in press.
- Barlow, R.G., Cummings, D.G., Gibb, S.W., 1997. Improved resolution of mono- and divinyl chlorophylls *a* and *b* and zeaxanthin and lutein in phytoplankton extracts using reverse phase C-8 HPLC. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 161, 303–307. <https://doi.org/10.3354/meps161303>
- Bartolini, F., Cimò, F., Fusi, M., Dahdouh-Guebas, F., Lopes, G.P., Cannicci, S., 2011. The effect of sewage discharge on the ecosystem engineering activities of two East African fiddler crab species: Consequences for mangrove ecosystem functioning. *Mar. Environ. Res.* 71, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2010.10.002>
- Bartolini, F., Penha-Lopes, G., Limbu, S., Paula, J., Cannicci, S., 2009. Behavioural responses of the mangrove fiddler crabs (*Uca annulipes* and *U. inversa*) to urban sewage loadings: Results of a mesocosm approach. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1860–1867. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.07.019>
- Benner, R., Hodson, R.E., 1985. Microbial degradation of the leachable and lignocellulosic components of leaves and wood from *Rhizophora mangle* in a tropical mangrove swamp. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 23, 221–230.
- Blasco, F., 1991. LES MANGROVES. *La Recherche* 444–453.
- Boto, K.G., Wellington, J.T., 1984. Soil characteristics and nutrient status in a Northern Australian mangrove forest. *Estuaries* 7, 61–69. <https://doi.org/10.2307/1351957>
- Botto, F., Iribarne, O., Gutierrez, J., Bava, J., Gagliardini, A., Valiela, I., 2006. Ecological importance of passive deposition of organic matter into burrows of the SW Atlantic crab *Chasmagnathus granulatus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 312, 201–210.
- Bouchez, A., Pascual, N., Chardon, C., Bouvy, M., Cecchi, P., Lambs, L., Herteman, M., Fromard, F., Got, P., Leboulanger, C., 2013. Mangrove microbial diversity and the impact of trophic contamination. *Mar. Pollut. Bull.* 66, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.015>

- Camilleri, J.C., 1992. Leaf-litter processing by invertebrates in a mangrove forest in Queensland. *Mar. Biol.* 114, 139–145. <https://doi.org/10.1007/BF00350863>
- Cannicci, S., Bartolini, F., Dahdouh-Guebas, F., Fratini, S., Litulo, C., Macia, A., Mrabu, E.J., Penha-Lopes, G., Paula, J., 2009. Effects of urban wastewater on crab and mollusc assemblages in equatorial and subtropical mangroves of East Africa. *Estuar. Coast. Shelf Sci., Marine Science in the Western Indian Ocean Responds to Population Pressures and Climate Change* 84, 305–317. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.04.021>
- Cannicci, S., Burrows, D., Fratini, S., Smith III, T.J., Offenberg, J., Dahdouh-Guebas, F., 2008. Faunal impact on vegetation structure and ecosystem function in mangrove forests: A review. *Aquat. Bot., Mangrove Ecology – Applications in Forestry and Coastal Zone Management* 89, 186–200. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2008.01.009>
- Carpentier, A., Como, S., Dupuy, C., Lefrançois, C., Feunteun, E., 2014. Feeding ecology of *Liza spp.* in a tidal flat: Evidence of the importance of primary production (biofilm) and associated meiofauna. *J. Sea Res.* 92, 86–91.
- Chinnadurai, G., Fernando, O.J., 2007. Meiofauna of mangroves of the southeast coast of India with special reference to the free-living marine nematode assemblage. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 72, 329–336. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2006.11.004>
- Clough, B., 1998. Mangrove forest productivity and biomass accumulation in Hinchinbrook Channel, Australia. *Mangroves Salt Marshes* 2, 191–198. <https://doi.org/10.1023/A:1009979610871>
- Clough, B.F., Ong, J.E., Gong, W.K., 1997. Estimating leaf area index and photosynthetic production in canopies of the mangrove *Rhizophora apiculata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 285–292.
- Dahdouh-Guebas, F., Giuggioli, M., Oluoch, A., Vannini, M., Cannicci, S., 1999. Feeding habits of non-ocypodid crabs from two mangrove forests in Kenya. *Bull. Mar. Sci.* 64, 291–297.
- Das, A., Parida, A., Basak, U., Das, P., 2002. Studies on pigments, proteins and photosynthetic rates in some mangroves and mangrove associates from Bhitarkanika, Orissa. *Mar. Biol.* 141, 415–422. <https://doi.org/10.1007/s00227-002-0847-0>
- Debenay, J.-P., Marchand, C., Molnar, N., Aschenbroich, A., Meziane, T., 2015. Foraminiferal assemblages as bioindicators to assess potential pollution in mangroves used as a natural biofilter for shrimp farm effluents (New Caledonia). *Mar. Pollut. Bull.* 93, 103–120.
- Delabie, J.H.C., Paim, V.R.L. de M., do Nascimento, I.C., Campiolo, S., Mariano, C. dos S.F., 2006. Ants as biological indicators of human impact in mangroves of the Southeastern Coast of Bahia, Brazil. *Neotrop. Entomol.* 35, 602–615. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2006000500006>
- Della Patrona, L., Marchand, C., Hubas, C., Molnar, N., Deborde, J., Meziane, T., 2016. Meiofauna distribution in a mangrove forest exposed to shrimp farm effluents (New Caledonia). *Mar. Environ. Res.* 119, 100–113. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.05.028>
- Du, Y., Gao, S., Warwick, R.M., Hua, E., 2014. Ecological functioning of free-living marine nematodes in coastal wetlands: an overview. *Chin. Sci. Bull.* 59, 4692–4704. <https://doi.org/10.1007/s11434-014-0592-z>
- Duke, N.C., 2016. Oil spill impacts on mangroves: Recommendations for operational planning and action based on a global review. *Mar. Pollut. Bull., Turning the tide on mangrove loss* 109, 700–715. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.082>
- Dumont, H.J., Velde, I.V. de, Dumont, S., 1975. The dry weight estimate of biomass in a selection of Cladocera, Copepoda and Rotifera from the plankton, periphyton and

- benthos of continental waters. *Oecologia* 19, 75–97.  
<https://doi.org/10.1007/BF00377592>
- Eshky, A.A., Taylor, A.C., Atkinson, R.J.A., 1996. The effects of temperature on aspects of respiratory physiology of the semi-terrestrial crabs, *Uca inversa* (Hoffmann) and *Metopograpsus messor* (Forskål) from the Red Sea. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 114, 297–304. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(96\)00007-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(96)00007-2)
- Ewel, K., Twilley, R., Ong, J., 1998. Different kinds of mangrove forests provide different goods and services. *Glob. Ecol. Biogeogr. Lett.* 7, 83–94.  
<https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.1998.00275.x>
- Feller, I.C., Lovelock, C.E., Berger, U., McKee, K.L., Joye, S.B., Ball, M.C., 2010. Biocomplexity in mangrove ecosystems. *Annu. Review Mar. Sci.* 2, 395–417.
- Frusher, S.D., Giddins, R.L., Smith, T.J., 1994. Distribution and abundance of grapsid crabs (Grapsidae) in a mangrove estuary: effects of sediment characteristics, salinity tolerances, and osmoregulatory ability. *Estuaries Coasts* 17, 647–654.
- Giere, O., 2009. *Meiobenthology: the microscopic motile fauna of aquatic sediments*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. ed. Springer Science & Business Media.
- Gillikin, D.P., Schubart, C.D., 2004. Ecology and systematics of mangrove crabs of the genus *Perisesarma* (Crustacea: Brachyura: Sesarmidae) from East Africa. *Zool. J. Linn. Soc.* 141, 435–445. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2004.00125.x>
- Gómez Noguera, S.E., Hendrickx, M.E., 1997. Distribution and abundance of meiofauna in a Subtropical Coastal Lagoon in the south-eastern Gulf of California, Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* 34, 582–587. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(96\)00016-1](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(96)00016-1)
- Gutiérrez, J.L., Jones, C.G., Groffman, P.M., Findlay, S.E.G., Iribarne, O.O., Ribeiro, P.D., Bruschetti, C.M., 2006. The contribution of crab burrow excavation to carbon availability in surficial salt-marsh sediments. *Ecosystems* 9, 647–658.  
<https://doi.org/10.1007/s10021-006-0135-9>
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron.* 4, 1–9.
- Herteman, M., 2010. Evaluation des capacités bioremédiatrices d’une mangrove impactée par des eaux usées domestiques. Application au site pilote de Malamani, Mayotte. PHD Toulouse Université Paul Sabatier.
- Herteman, M., Fromard, F., Lambs, L., 2011. Effects of pretreated domestic wastewater supplies on leaf pigment content, photosynthesis rate and growth of mangrove trees: A field study from Mayotte Island, SW Indian Ocean. *Ecol. Eng.* 37, 1283–1291.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.03.027>
- Jones, C.G., Lawton, J.H., Shachak, M., 1994. Organisms as ecosystem engineers, in: *Ecosystem Management*. Springer, pp. 130–147.
- Kauffman, J.B., Donato, D., 2012. Protocols for the measurement, monitoring and reporting of structure, biomass and carbon stocks in mangrove forests. Center for International Forestry Research (CIFOR), Bogor, Indonesia.
- Kitajima, K., Hogan, K.P., 2003. Increases of chlorophyll *a/b* ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. *Plant Cell Environ.* 26, 857–865. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01017.x>
- Komiyama, A., Havanond, S., Srisawatt, W., Mochida, Y., Fujimoto, K., Ohnishi, T., Ishihara, S., Miyagi, T., 2000. Top/root biomass ratio of a secondary mangrove (*Ceriops tagal* (Perr.) C.B. Rob.) forest. *For. Ecol. Manag.* 139, 127–134.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(99\)00339-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(99)00339-4)
- Komiyama, A., Ong, J.E., Pongparn, S., 2008. Allometry, biomass, and productivity of mangrove forests: A review. *Aquat. Bot.* 89, 128–137.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.12.006>

- Komiyama, A., Pongparn, S., Kato, S., 2005. Common allometric equations for estimating the tree weight of mangroves. *J. Trop. Ecol.* 21, 471–477. <https://doi.org/10.1017/S0266467405002476>
- Kristensen, E., 2008. Mangrove crabs as ecosystem engineers; with emphasis on sediment processes. *J. Sea Res.* 59, 30–43.
- Kristensen, E., Andersen, F.Ø., Kofoed, L.H., 1988. Preliminary assessment of benthic community metabolism in a south-east Asian mangrove swamp. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 137–145.
- Lee, S.Y., 2008. Mangrove macrobenthos: assemblages, services, and linkages. *J. Sea Res.* 59, 16–29.
- Lee, S.Y., 1998. Ecological role of grapsid crabs in mangrove ecosystems: a review. *Mar. Freshw. Res.* 49, 335–343. <https://doi.org/10.1071/mf97179>
- Lee, S.Y., 1995. Macrobenthic community structure of a polluted tidal river in Deep Bay, Hong Kong. *Mar. Biol. South China Sea II* Eds B Morton G Xu R Zou J Pan G Cai Pp 43–51.
- Lee, S.Y., Primavera, J.H., Dahdouh-Guebas, F., McKee, K., Bosire, J.O., Cannicci, S., Diele, K., Fromard, F., Koedam, N., Marchand, C., Mendelssohn, I., Mukherjee, N., Record, S., 2014. Ecological role and services of tropical mangrove ecosystems: a reassessment. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 23, 726–743. <https://doi.org/10.1111/geb.12155>
- Lewis, M., Pryor, R., Wilking, L., 2011. Fate and effects of anthropogenic chemicals in mangrove ecosystems: A review. *Environ. Pollut.* 159, 2328–2346. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.027>
- Litulo, C., 2005. Population biology of the fiddler crab *Uca annulipes* (Brachyura: Ocypodidae) in a tropical East African mangrove (Mozambique). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 62, 283–290.
- Lovelock, C.E., Ball, M.C., Martin, K.C., Feller, I.C., 2009. Nutrient enrichment increases mortality of mangroves. *PLOS ONE* 4, e5600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005600>
- Lovelock, C.E., Feller, I.C., McKee, K.L., Engelbrecht, B.M.J., Ball, M.C., 2004. The effect of nutrient enrichment on growth, photosynthesis and hydraulic conductance of dwarf mangroves in Panamá. *Funct. Ecol.* 18, 25–33. <https://doi.org/10.1046/j.0269-8463.2004.00805.x>
- MacFarlane, G.R., Burchett, M.D., 2001. Photosynthetic Pigments and Peroxidase Activity as Indicators of Heavy Metal Stress in the Grey Mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 233–240. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(00\)00147-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00147-8)
- Martin, K.C., Bruhn, D., Lovelock, C.E., Feller, I.C., Evans, J.R., Ball, M.C., 2010. Nitrogen fertilization enhances water-use efficiency in a saline environment. *Plant Cell Environ.* 33, 344–357. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02072.x>
- McGuinness, K.A., 1997. Dispersal, establishment and survival of *Ceriops tagal* propagules in a north Australian mangrove forest. *Oecologia* 109, 80–87. <https://doi.org/10.1007/s004420050061>
- Mirto, S., Bianchelli, S., Gambi, C., Krzelj, M., Pusceddu, A., Scopa, M., Holmer, M., Danovaro, R., 2010. Fish-farm impact on metazoan meiofauna in the Mediterranean Sea: Analysis of regional vs. habitat effects. *Mar. Environ. Res.* 69, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.07.005>
- Moens, T., Traunspurger, W., Bergtold, M., 2006. Feeding ecology of free-living benthic nematodes. *Freshw. Nematodes Ecol. Taxon. CAB Int. Publ. Camb.* 105–131.

- Moens, T., Vincx, M., 1997. Observations on the Feeding Ecology of Estuarine Nematodes. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 77, 211–227. <https://doi.org/10.1017/S0025315400033889>
- Mokievsky, V.O., Tchesunov, A.V., Udalov, A.A., Toan, N.D., 2011. Quantitative distribution of meiobenthos and the structure of the free-living nematode community of the mangrove intertidal zone in Nha Trang bay (Vietnam) in the South China Sea. *Russ. J. Mar. Biol.* 37, 272–283. <https://doi.org/10.1134/S1063074011040109>
- Molnar, N., Welsh, D.T., Marchand, C., Deborde, J., Meziane, T., 2013. Impacts of shrimp farm effluent on water quality, benthic metabolism and N-dynamics in a mangrove forest (New Caledonia). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 117, 12–21.
- Nagelkerken, I., Blaber, S.J.M., Bouillon, S., Green, P., Haywood, M., Kirton, L.G., Meynecke, J.-O., Pawlik, J., Penrose, H.M., Sasekumar, A., Somerfield, P.J., 2008. The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: A review. *Aquat. Bot.* 89, 155–185. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.12.007>
- Nam, V.N., Sasmito, S.D., Murdiyarso, D., Purbopuspito, J., MacKenzie, R.A., 2016. Carbon stocks in artificially and naturally regenerated mangrove ecosystems in the Mekong Delta. *Wetl. Ecol. Manag.* 24, 231–244. <https://doi.org/10.1007/s11273-015-9479-2>
- Negri, A.P., Flores, F., Mercurio, P., Mueller, J.F., Collier, C.J., 2015. Lethal and sub-lethal chronic effects of the herbicide diuron on seagrass. *Aquat. Toxicol.* 165, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.05.007>
- Nobbs, M., McGuinness, K.A., 1999. Developing methods for quantifying the apparent abundance of fiddler crabs (Ocypodidae: *Uca*) in mangrove habitats. *Austral Ecol.* 24, 43–49.
- Olguin, E.J., Hernandez, M.E., Sanchez-Galvan, G., 2007. Hydrocarbon mangroves pollution and bioremediation, phytoremediation and restoration strategies. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 23, 139–154.
- Pearson, T.H., Rosenberg, R., 1978. Macrobenthic succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment. *Ocean. Mar Biol Ann Rev* 16, 229–311.
- Penha-Lopes, G., Bartolini, F., Limbu, S., Cannicci, S., Kristensen, E., Paula, J., 2009. Are fiddler crabs potentially useful ecosystem engineers in mangrove wastewater wetlands? *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1694–1703. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.06.015>
- Penha-Lopes, G., Bartolini, F., Limbu, S., Cannicci, S., Mgaya, Y., Kristensen, E., Paula, J., 2010. Ecosystem engineering potential of the gastropod *Terebralia palustris* (Linnaeus, 1767) in mangrove wastewater wetlands – A controlled mesocosm experiment. *Environ. Pollut.* 158, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.07.009>
- Prasad, M.B.K., 2012. Nutrient stoichiometry and eutrophication in Indian mangroves. *Environ. Earth Sci.* 67, 293–299. <https://doi.org/10.1007/s12665-011-1508-8>
- Robertson, A.A., Alongi, D.D., others, 1992. Tropical Mangrove Ecosystems. Coastal and Estuarine Studies. 41. American Geophysical Union.
- Schmid-Araya, J.M., Schmid, P.E., 2000. Trophic relationships: integrating meiofauna into a realistic benthic food web. *Freshw. Biol.* 44, 149–163. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2000.00594.x>
- Silva-Camacho, D.D.S., Gomes, R.D.S., Santos, J.N.S., Araújo, F.G., 2017. Distribution of benthic fauna in sediment grains and prop roots of a mangrove channel in south-eastern Brazil. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 97, 377–385. <https://doi.org/10.1017/S0025315416000485>
- Skov, M., Vannini, M., Shunula, J., Hartnoll, R., Cannicci, S., 2002. Quantifying the density of mangrove crabs: Ocypodidae and Grapsidae. *Mar. Biol.* 141, 725–732. <https://doi.org/10.1007/s00227-002-0867-9>
- Smith, T.J., Boto, K.G., Frusher, S.D., Giddins, R.L., 1991. Keystone species and mangrove forest dynamics: the influence of burrowing by crabs on soil nutrient status and forest

- productivity. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 33, 419–432. [https://doi.org/10.1016/0272-7714\(91\)90081-L](https://doi.org/10.1016/0272-7714(91)90081-L)
- Spalding, M., Blasco, F., Field, C., 1997. World mangrove atlas., Biodiversity. International Society for Mangrove Ecosystems.
- Steinke, T.D., Rajh, A., Holland, A.J., 1993. The feeding behaviour of the red mangrove crab *Sesarma meinerti* De Man, 1887 (Crustacea: Decapoda: Grapsidae) and its effect on the degradation of mangrove leaf litter. *South Afr. J. Mar. Sci.* 13, 151–160.
- Sutherland, T.F., Levings, C.D., Petersen, S.A., Poon, P., Piercey, B., 2007. The use of meiofauna as an indicator of benthic organic enrichment associated with salmonid aquaculture. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1249–1261. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.03.024>
- Tam, N.F.Y., Wong, A.H.Y., Wong, M.H., Wong, Y.S., 2009. Mass balance of nitrogen in constructed mangrove wetlands receiving ammonium-rich wastewater: Effects of tidal regime and carbon supply. *Ecol. Eng.* 35, 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.05.011>
- Traunspurger, W., 1997. Bathymetric, seasonal and vertical distribution of feeding-type of nematodes in an oligotrophic lake. *Vie Milieu* 47, 1–7.
- Warren, J.H., 1990. Role of burrows as refuges from subtidal predators of temperate mangrove crabs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 67, 295–299.
- Wear, R.J., Tanner, J.E., 2007. Spatio-temporal variability in faunal assemblages surrounding the discharge of secondary treated sewage. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 73, 630–638. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.03.008>
- Wickramasinghe, S., Borin, M., Kotagama, S.W., Cochard, R., Anceno, A.J., Shipin, O.V., 2009. Multi-functional pollution mitigation in a rehabilitated mangrove conservation area. *Ecol. Eng.* 35, 898–907. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.021>
- Wieser, W., 1959. The effect of grain size on the distribution of small invertebrates inhabiting the beaches of Puget Sound. *Limnol. Oceanogr.* 181–194.
- Wieser, W., 1953. Die Beziehung zwischen Mundhöhlengestalt, Ernährungsweise und Vorkommen bei freilebenden marinen Nematoden : eine ökologisch-morphologische Studie. *Ark Zool* 2, 439–484.
- Wong, Y.S., Lan, C.Y., Chen, G.Z., Li, S.H., Chen, X.R., Liu, Z.P., Tam, N.F.Y., 1995. Effect of wastewater discharge on nutrient contamination of mangrove soils and plants. *Hydrobiologia* 295, 243–254. <https://doi.org/10.1007/BF00029131>
- Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., Lan, C.Y., 1997. Mangrove wetlands as wastewater treatment facility: a field trial, in: Wong, Y.-S., Tam, N.F.-Y. (Eds.), *Asia-Pacific Conference on Science and Management of Coastal Environment, Developments in Hydrobiology*. Springer Netherlands, pp. 49–59. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-5234-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-011-5234-1_6)
- Wu, Y., Chung, A., Tam, N.F.Y., Pi, N., Wong, M.H., 2008. Constructed mangrove wetland as secondary treatment system for municipal wastewater. *Ecol. Eng.* 34, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.07.010>
- Zhang, Z.-W., Xu, X.-R., Sun, Y.-X., Yu, S., Chen, Y.-S., Peng, J.-X., 2014. Heavy metal and organic contaminants in mangrove ecosystems of China: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 11938–11950. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3100-8>
- Zhou, H., 2001. Effects of leaf litter addition on meiofaunal colonization of azoic sediments in a subtropical mangrove in Hong Kong. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 256, 99–121. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00310-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00310-5)
- Zhou, X., Cai, L., Fu, S., 2015. Comparison of meiofaunal abundance in two mangrove wetlands in Tong'an Bay, Xiamen, China. *J. Ocean Univ. China JOUC* 14, 816.





**Chapitre 5 : Dynamiques de réponse  
résistance/résilience de la végétation et de la faune  
d'une mangrove soumise à une perturbation**



Ce chapitre fait l'objet d'un article scientifique en préparation intitulé :

Dynamic response of vegetation and fauna from mangrove ecosystem subjected to anthropic disturbances

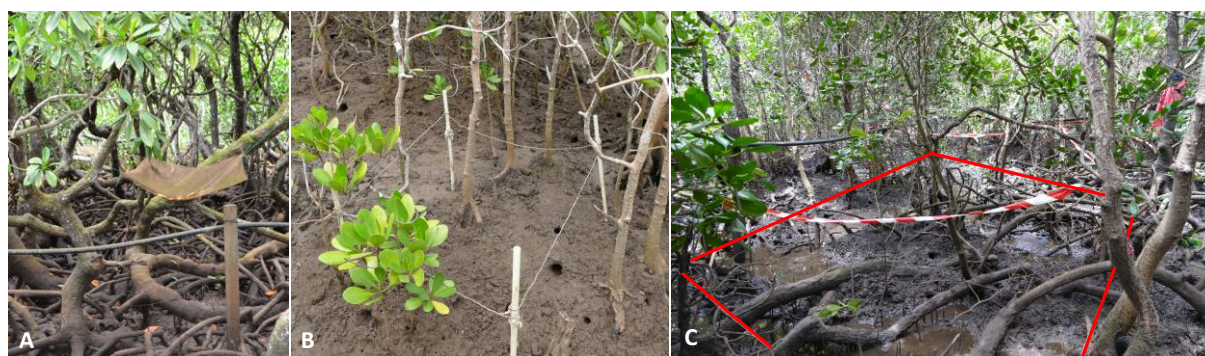
Les résultats des chapitres 3 et 4 ont révélé les propriétés de résistance des communautés microbiennes, de la végétation et de la faune suite à une perturbation à long terme sans dysfonctionnement majeur de ces compartiments et de l'écosystème mangrove. Cependant les rejets d'EUD ont induit une augmentation de la croissance végétale et de la densité microbienne, ainsi que des modifications de structure des communautés microbiennes, des crabes et de la méiofaune. Le faciès *C. tagal* est apparu plus résistant aux rejets d'EUD que le faciès *R. mucronata*, donc à privilégier pour la bio-épuration des EUD par la mangrove.

Les communautés de ces faciès de mangrove sont exposées à des contraintes environnementales différentes selon le faciès. Dans le faciès *R. mucronata*, les conditions sont plus constantes, tamponnées par les marées, mais la durée d'immersion entraîne une anoxie plus longue des sédiments. Dans le faciès *C. tagal*, l'influence des marées est moins importante, rendant les périodes d'anoxie plus courtes, mais les organismes sont exposés à des variations beaucoup plus fortes des autres facteurs environnementaux (température, aridité, salinité). Nous savons à ce stade de l'étude que l'écosystème mangrove est résistant à long terme, mais nous n'avons ni déterminé la résistance de l'écosystème à court terme, ni sa capacité de résilience lors du retrait de la perturbation. Le faciès *C. tagal* étant plus sujet à de fortes variations environnementales, cette zone favoriserait l'installation d'espèces plus résistantes aux perturbations. Nous faisons donc l'hypothèse que, comme à long terme, il serait plus résistant et surtout davantage résilient que le faciès *R. mucronata* à une perturbation anthropique de court terme.

Le dispositif expérimental du site d'étude de Malamani a donc été modifié pour évaluer la résistance et la résilience à court terme (pendant 2 ans) des compartiments de la mangrove dans les faciès *C. tagal* et *R. mucronata*. Depuis Octobre 2015 (le T0), les 10 m<sup>3</sup> d'EUD prétraitées sont désormais déversés perpendiculairement à l'ancien système de rejet dans deux parcelles de mangrove (225 m<sup>2</sup>) pour chaque faciès (voir **Figure 20**, dans le chapitre 2). Une de ces 2 parcelles reste impactée par les rejets depuis 2008 (I – I, impacté – impacté), l'autre est exposée aux rejets depuis le T0 de 2015 (T – I, témoin – impacté). A ces 2 parcelles impactées, se rajoutent 2 parcelles « témoin » dans chaque faciès. La première n'a jamais reçu de rejet depuis

2008 (T – T, témoin – témoin), la seconde été exposée aux rejets avant le T0 de 2015 et ne reçoit désormais plus d'EUD prétraitées (I – T, impacté – témoin).

Ce chapitre a pour objectif de déterminer les capacités de résistance et de résilience de la végétation et des crabes de chaque faciès de mangrove jusqu'à 24 mois de perturbation par les EUD prétraitées. En parallèle à cette étude, l'impact à plus long terme (7,5 à 9,5 ans) a été évalué sur les parcelles I – I. La communauté de crabes et la production de feuilles ont été suivies tout au long de l'expérience dans des filets et des quadrats délimités (**Figure 24**), alors que les analyses de feuilles (aire et contenu pigmentaire) ont été réalisées après 12 et 19 mois. Enfin l'analyse de la canopée par l'index NDVI (« Normalized Difference Vegetation Index ») a été faite à T0 et après 23 mois. Les suivis ont été réalisés dans des placettes bien définies identiques à celles du chapitre 4.



**Figure 24.** Représentation des différents types d'échantillonnage dans toutes les parcelles : (A) collecteur de litière, (B) quadrat de suivi de la communauté de crabes, (C) placette d'échantillonnage de sédiments.

Les résultats ont montré que les effets à court terme des EUD prétraitées apparaissent rapidement sur la végétation et les communautés de crabes, entre 12 et 24 mois. Ceci s'est traduit, tout comme après une perturbation à long terme, par une stimulation de la végétation. Les EUD ont également induit une baisse de la densité et de la diversité des populations de crabes. Les parcelles I – I des deux faciès nous ont permis de suivre la végétation et les crabes après 2 années supplémentaires de rejet et de montrer un accroissement des effets des EUD sur les compartiments de la mangrove, en particulier pour les crabes.

Enfin, les résultats ont révélé que le faciès *R. mucronata* est plus résistant que le faciès *C. tagal* à un impact à court terme, ce qui a contredit notre hypothèse. En revanche, les différences entre « témoin » et « impacté » sont à nuancer car la parcelle témoin du faciès *R. mucronata* a

légèrement été contaminée par la parcelle impactée voisine du fait de la pente naturelle du site d'étude parallèle au front de mer.

En plus d'être résistante aux EUD, la végétation a montré des capacités de résilience dans les deux faciès moins de 24 mois après l'arrêt des rejets, mais les effets étaient plus marqués pour le faciès *R. mucronata*. En revanche, aucune résilience n'a été observée sur la communauté des crabes dans ce faciès alors qu'elle a été observée dans le faciès *C. tagal*.

Ce chapitre a montré des capacités de résistance et de résilience pour les deux faciès de mangrove, mais suivant le compartiment observé, les réponses sont variables. Si la végétation est considérée, le faciès *R. mucronata* serait plus intéressant comme exutoire d'EUD prétraitées à court terme. Mais selon la réponse de la communauté de crabes, le faciès *C. tagal* semblerait plus pertinent.

# **Dynamic response of vegetation and fauna from mangrove ecosystem subjected to anthropic disturbances**

Capdeville C.<sup>a</sup>, Abdallah K.<sup>b</sup>, Walcker R.<sup>a</sup>, Rols J.L.<sup>a</sup>, Fromard F.<sup>a</sup>, Leflaive J.<sup>a \*</sup>

<sup>a</sup>EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France

<sup>b</sup>Syndicat Intercommunal d'Eau et d'Assainissement de Mayotte, France

\*Corresponding author: josephine.leflaive@univ-tlse3.fr

EcoLab-Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement  
UMR 5245 CNRS-UPS-INPT  
Université Toulouse III - Paul Sabatier, Bât 4R1,  
118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 9

## **Abstract**

**Key words:** anthropic disturbance, resistance, resilience, vegetation, crab.

### **1. Introduction**

Mangrove forests are ecotone ecosystems influenced by tides in tropical and subtropical latitudes (Blasco, 1991; Spalding et al., 1997). They establish in coastal shallow areas, sheltered from the wave energy (Thom et al., 1984). These overall nutrient-poor forests (Boto and Wellington, 1984) have a high litter productivity and they are the main source of organic matter for the coastal marine food webs (Komiyama et al., 2000; Mohamed et al., 2016). Mangrove forests provide an important number of ecosystem services for human society and marine communities such as providing varied food and material resources (Giri et al., 2011; Lee et al., 2014). Thanks to the tree roots, they participate to the sediment stability (Blasco, 1991) and the protection of coasts from erosion, wind, tsunamis and cyclones (Alongi, 2008). They are essential for the local fauna providing habitats for fishes, prawns and crabs (Aburto-Oropeza et al., 2008), as well as for birds, mammals and reptiles (Alongi, 2002). Mangroves actively participate to the nutrient trapping and remineralization of organic matter from leaching of soils (Ewel et al., 1998; Wang et al., 2010). Finally, they have also a high potential of carbon

sequestration and storage due to rapid rates of net primary production and sedimentation (Komiyama et al., 2008; Donato et al., 2011; Alongi, 2012).

Despite their significance, mangroves are threatened environments. In 2014, global mangroves were estimated to cover 81,484 km<sup>2</sup> of the earth's surface (119 278 km<sup>2</sup> for the 1980s), namely around 0.7 % of tropical forest surface (Hamilton and Casey, 2016), over 110 countries and territories (Giri et al., 2011). In addition to being continuously submitted to environmental pressures (salinity gradients, tidal cycle, soil instability, alternating seasons, temperature) (Feller et al., 2010), mangroves are also affected by anthropic pressures caused by the proximity with urban centers and aquatic farms (Prasad, 2012; Zhang et al., 2014). Currently, 32 % of mangroves have disappeared since the 1980s because of anthropic activities (Giri et al., 2011; Hamilton and Casey, 2016): overexploitation of wood (Alongi, 2002), deforestation to develop aquaculture, agriculture, tourism and urban development (Giri et al., 2011). Mangrove trees and sediment biocenosis are directly exposed to the pollutants resulting from human activities that accumulate in sediments such as heavy metals or organic contaminants like pesticides (Lewis et al., 2011; Zhang et al., 2014), oil spills (Duke, 2016), domestic or industrial wastewaters (Bartolini et al., 2011; Molnar et al., 2013).

The stability of mangroves exposed to anthropogenic disturbances is defined by its properties of resistance and resilience (Pimm, 1984). The resistance is the degree to which a variable remains unmodified during the exposure to a disturbance while the resilience is defined as the rate of return to the initial equilibrium after the end of a disturbance (Pimm, 1984). The high resilience capacities of mangroves were revealed after strong natural events (*e.g.* hurricane, intensive winds and drought events) by the recovery of parameters as the normalized difference vegetation index (NDVI) (Galeano et al., 2017) and the net primary productivity (Danielson et al., 2017). In contrast, there is a lack of knowledge on the resilience capacities of mangrove following their exposure to pollutants. The stability of mangrove ecosystem strongly depends on the stabilities of both vegetation, which defines the mangrove forests (Spalding et al., 2010) and fauna, particularly the crabs, engineer species of this environment (Jones et al., 1994; Lee, 1998). Crabs, by their habitat and their bioturbation activity, play a crucial ecological role in the structural and functional stability of mangrove ecosystem (Cannicci et al., 2008). They physically modify the structure of sediments (Kristensen, 2008), favor its oxygenation (Smith et al., 1991) and its enrichment in organic matter (burying leaves and propagules into their hole) (Camilleri, 1992). They improve as well the circulation of water and organic matter (Botto et

al., 2006; Gutiérrez et al., 2006). Mangroves are organized in strips of vegetation dominated by a few mangrove tree species arranged along environmental gradients (salinity, nutrient availability, temperature), according to the sediment characteristics and the length of immersion by tides (Ball, 1998; Robertson et al., 1992). In such heterogeneous systems, the response of biocenosis to anthropic pressures is hard to predict. One critical question is to understand how the stability of mangroves varies among the different zones of vegetation. This would indeed influence the conservation strategies for these threatened environments. Our main hypothesis is that some mangrove zones are more resistant and more resilient to disturbances than others, because of the natural constraints they are subjected to.

To test this hypothesis, we focused on two contrasted mangrove zones, one dominated by *Rhizophora* trees, the other one by *Ceriops* trees. The species belonging to the *Rhizophora* genus are generally distributed in the zone flooded at each tide whereas the trees belonging to the *Ceriops* genus are generally established in zones less exposed to tides and more submitted to aridity and salinity (Spalding et al., 2010; Tomlinson, 2016). In these mangrove zones, trees and other organisms are exposed to different set of constraints. In the *Rhizophora*-dominated zone the conditions are more constant, buffered by the tides but the longer immersion duration leads to longer anoxia of the sediment. In the *Ceriops*-dominated zone, the influence of tides is less important, the anoxia periods are shorter but the organisms are exposed to much stronger variations of the other environmental conditions. Regarding these contrasted characteristics, it would be relevant to compare the level of resistance and resilience of these two mangrove zones. In this prospect, we used an *in situ* pilot project set up since 2008 in a mangrove of Mayotte Island in order to assess the ability of mangroves to be used as a receptacle for pretreated wastewaters (PW) (Herteman et al., 2011). This project allowed to determine the long-term responses of the vegetation and fauna in *Ceriops tagal*- and *Rhizophora mucronata*-dominated zones exposed for more of 6 years to daily PW discharges (Capdeville et al., 2018). The results showed a moderate long-term impact of PW on the ecosystem without dysfunction of these compartments, which helped to highlight long-term resistance properties of the mangrove. However, the discharges induced a stronger growth of mangrove trees in both zones and a modification of the crab and meiofauna structure. The *R. mucronata* mangrove zone, which is more buffered by the tides, appeared more resistant than the *C. tagal* mangrove zone (Capdeville et al., 2018). Besides these information on the long-term response of mangrove zones to anthropogenic disturbance, the remaining question is what would be the short-term resistance and the resilience capacities of these systems. A previous study in the same










experimental system showed that an impact of PW would appear after few months of discharges, as reflected by an increase of mangrove tree growth, leaf pigment content and litter productivity (Herteman et al., 2011). In the present study, this experimental system was modified to assess the resilience and short-term resistance of mangrove trees and crabs community from the two different mangrove zones. Our hypotheses are that (i) the short-term impact of anthropic disturbance will be lower in *C. tagal* mangrove zone, which is more subjected to environmental variations than the *R. mucronata* mangrove zone, because this constraints would favor the installation of species more resistant to disturbance, (ii) the mangrove compartments of the two zones have fast resilience capacities and (iii) the resilience will be more marked in the *C. tagal* mangrove zone.

## 2. Material and methods








### 2.1. Study site

Since April 2008, an *in situ* experimental system has been running in the mangrove of Chirongui Bay, South-West of Mayotte Island, a French department located in the Mozambique Channel, South-West of Indian Ocean (12°55'S, 45°09'E), as described by Herteman *et al.* (2011). This study site continuously collects domestic wastewaters from Malamani village (250 inhabitants-equivalent). The wastewaters are pretreated in a horizontal primary settlement tank with integrated sludge digester. Then, they are carried through a pipe network to the mangrove areas. PW are characterized by nitrogen and phosphorous inputs as described by Capdeville *et al.* (2018). From April 2008 to October 2015, PW have been discharged once per 24 h, during a low tide, for one hour (10 m<sup>3</sup>) onto mangrove areas (around 675 m<sup>2</sup>, 15 m x 45 m) respectively dominated by the mangrove trees *Ceriops tagal* (Perr.) C.B. Robinson and *Rhizophora mucronata* Lam (Figure 1), giving an hydraulic loading rate of 14.8 L.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>, which is equivalent to a rainfall event of 14.8 mm. Close to these two “impacted” areas, two other areas not subjected to PW discharges were used as “control” areas (Figure 1).

#### Land cover:

-  Cultivated area and pasture
-  Barren salt-flat or "tanne"
-  Urban area
-  Swampy woodland of *Erythrina fusca*
-  *Avicennia marina* and/or *Heritiera littoralis*
-  *Ceriops tagal*
-  *Rhizophora mucronata*

#### Experimental setting:

-  Decanter-digester
  -  Piezometer
  -  Pipe
  -  Impacted plot
  -  Control plot
  -  Impacted plot
  -  Control plot
- Design from April 2008 to October 2015
- Design from October 2015 to October 2017

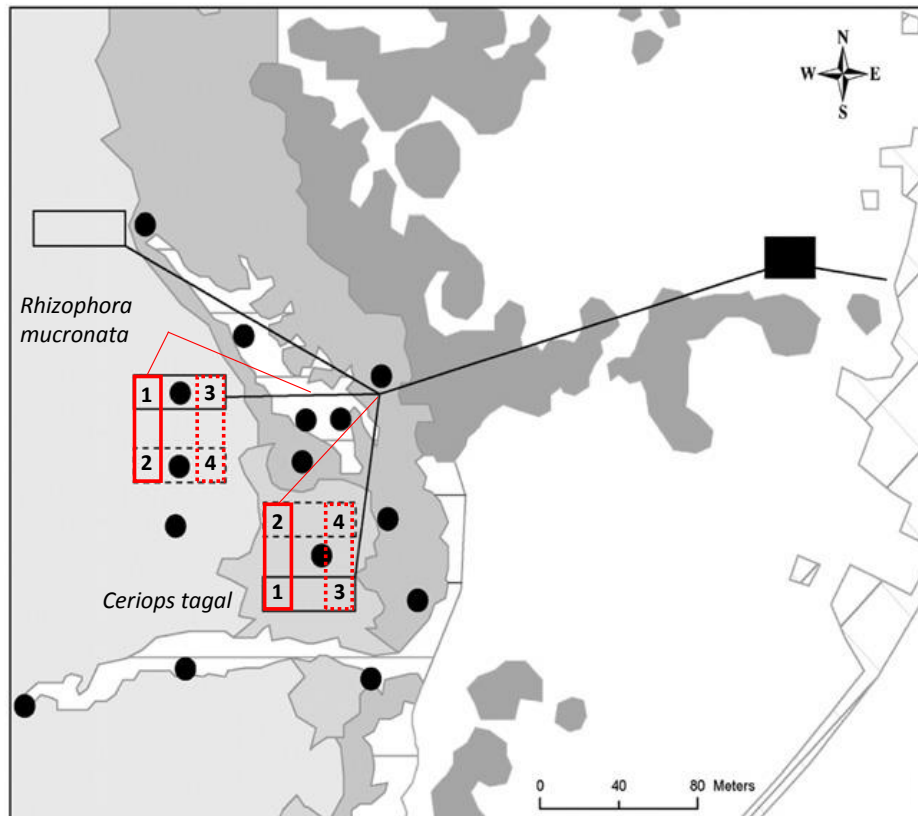


Figure 1. The study site (Malamani village in Mayotte Island) and the experimental setting: from April 2008 to October 2015 (black), the pipe network discharged the wastewaters in impacted areas in *Ceriops tagal* (*Ct*) and *Rhizophora mucronata* (*Rm*) mangrove zones, these areas were associated to control areas. From October 2015 to October 2017 (red), the experimental design was modified. The new areas were placed perpendicularly to the old areas. Four new areas were defined in both *Ct* and *Rm* mangrove zones: X-II: impacted area before October 2015 and still impacted, X-CI: control area become impacted area since October 2015, X-IC: impacted area become control area and X-CC: control area still control.

In October 2015 (T0), the experimental setting was changed to assess the resilience and the short-term resistance capacities of the mangrove ecosystem. In each mangrove zones, four different areas were defined (around 225 m<sup>2</sup>, 15 m x 15 m): one part of the initial impacted area

was still impacted in the new discharge network (R-II or C-II for impacted-impacted) while another one was no more subjected to PW discharge (R-IC or C-IC for impacted-control), one part of the initial control area was still a control (R-CC or C-CC for control-control) while another one started to receive PW discharge (R-CI or C-CI for control-impacted) (Figure 1). The impacted areas received the same PW discharge than before 2015, a volume of 10 m<sup>3</sup> each day per total red area (Figure 1).

The *R. mucronata*-dominated experimental areas are closer the lagoon (about 400 m) than the ones dominated by *C. tagal* (about 500 m), and are submerged in mean 4.33 hr/day against 0.88 hr/day for the other zone. The insular mangrove trees of the two mangrove zones suffer from environmental gradients and have a weak development. The height average of mangrove trees are 1.92 m and 2.92 m for *C. tagal* mangrove trees in control and impacted area, respectively, and 6.49 m and 8.85 m for *R. mucronata* mangrove trees in control and impacted areas, respectively. Besides, the *C. tagal* mangrove zone is a shrubby mangrove, characterized by a significant foliage yellowing (personal observations).

The PW were mainly composed of organic matter, nitrogen (mainly ammonia form) and phosphorus nutrients, discharged in the mangrove areas with surface loading rates (for dry season, in g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>) of 6.1 for Chemical Oxygen Demand, 2.0 for Biological Oxygen Demand after 5 days, 2.13 for Suspended Solids, 0.99 for total Nitrogen and 0.111 for total Phosphorus (data obtained from 2015 to 2017 from SIEAM, Mayotte, France). The crab community and litter production were monitored throughout the experiment (Figure 2). Leaf analyses (size and pigment content) were performed after 12 and 19 months and the analysis of the canopy by NDVI index was performed at T0 and after 23 months.

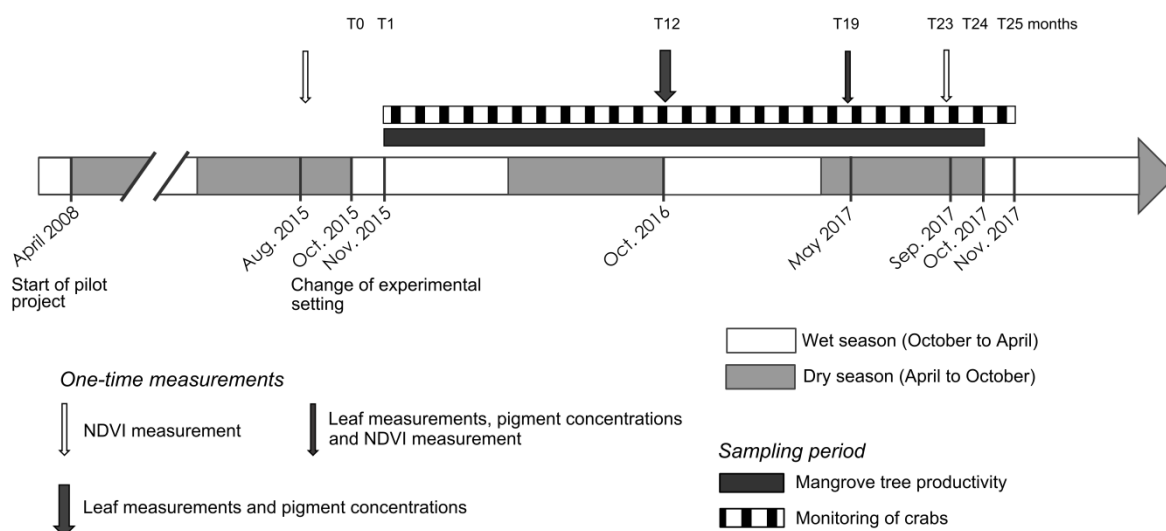


Figure 2: Organization of sampling during the study period from October 2015 (T0) to November 2017.

## 2.2. Measurements of canopy pigmentation by NDVI

### 2.2.1. Satellite imagery

Pléiades satellite images acquired over the study site during dry seasons 2015 and 2017 were used (Table 1).

Table 1: Characteristics of the Pléiades images used in this study. Tide level was estimated using the tide model of the French National Hydrographic and Oceanographic Administration (SHOM).

Satellite platform	Acquisition date	Time (UTC 0)	Tide level (m)
PHR 1A	2015-08-11	07:28	1.76 (rising)
PHR 1B	2017-09-11	07:17	2.13 (falling)

Images were provided by AIRBUS D&S and are available at <http://www.intelligence-airbusds.com/fr/4952-geostore>. Pléiades images were provided with a pixel size resolution of 2 meters in multispectral mode. Spectral channels available are blue (0.430 – 0.550  $\mu\text{m}$ ), green (0.500 – 0.620  $\mu\text{m}$ ), red (0.590 – 0.710  $\mu\text{m}$ ) and near infra-red (0.740 – 0.940  $\mu\text{m}$ ). The provider corrected geometrically and radiometrically images from ground and sensor distortion and systematic effects of the atmosphere (molecular or ‘Rayleigh’ diffusion). Four ground control points were manually added in order to correctly align images. BD ORTHO 2016 was chosen

as the target image to align other scenes. BD ORTHO 2016 was provided by the French Institute for Geographic and Forest Information and is available at <http://professionnels.ign.fr/donnees>.

### 2.2.2. Remote sensing vegetation index

Based on observations made over the field by aerial survey, high greenness of the mangrove canopy was assumed to correspond to wastewater impacted vegetation. In order to determine the density of green at top of canopy on satellite images, the Normalized Difference Vegetation Index (NDVI; Tucker (1979)) was calculated as follow:

$$NDVI = \frac{(NIR) - (R)}{(NIR) + (R)}$$

where R and NIR are the red and near infra-red channel, respectively. NDVI values were extracted inside each experimental 15 m x 15 m areas (C-II, C-IC, C-CC, C-CI, R-II, R-IC, R-CC, and R-CI) (64 values per area) and at each satellite date (2015, 2017). In order to compare values of between dates and areas,  $\Delta$ NDVI was calculated by subtracting to each NDVI value the mean of NDVI values for the corresponding control area (same vegetation and same date). The percent of NDVI increase was calculated by dividing this difference by the mean of the control.

### 2.3. Leaf measurements

On each of the 8 areas, 50 mature leaves of dominant mangrove tree species were randomly collected after 12 months (October 2016, end of dry season), and after 19 months (May 2017, end of rainy season). Dry weights of leaves were obtained after desiccation in an air oven at 60°C during 3 days. Leaf areas were estimated from digital pictures of leaves using Image J software (version 1.48h3) after color adjustment and binarization of pictures. The specific leaf area (SLA), *i.e.* the ratio between the leaf area and the leaf dry weight was then calculated.

### 2.4. Photosynthetic pigment analyses

On each of the 8 areas after 12 and 19 months since the beginning of the experiment, 12 mature leaves of the dominant mangrove tree species were randomly collected, kept in a cooler box during transport, and stored at -20°C until storage at -80°C at the laboratory. Pigments were

extracted from one disk (Ø 16 mm) per leaf. Disks were cut, crushed with 50 mg of Fontainebleau sand, and rinsed with 20 mL of methanol (Sigma-Aldrich, France). Around 20 mL of sample were transferred into a tube and placed in an ultrasound cold bath for 5 min. Mixtures were then placed at -20°C for 15 min and centrifuged at 4°C, 1700 g (High Conic Rotor, Thermo Scientific) for 5 min. One mL of supernatant was filtered on 0.2 µm PTFE membrane syringe filter (Ø 13 mm, VWR International, USA) and placed in a 2 mL-vial (Agilent Technologies). To prevent degradation of pigments, extractions were performed under dark conditions and samples stored on ice during handling. The extracts were stored a few days at -80°C before High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis with a 100 µL-loop auto-sampler and a quaternary solvent delivery system coupled to a diode array spectrophotometer (LC1200 series, Agilent technologies, USA). The mobile phase was prepared (solvent A: 70:30 (v/v) methanol: 1M ammonium acetate and solvent B: 100 % methanol) and programmed (minutes; % solvent A; % solvent B): (0; 75; 25), (1; 50; 50), (20; 30; 70), (25; 0; 100), (32; 0; 100) according to the analytical gradient protocol described by Barlow *et al.* (1997). The column was then reconditioned to original conditions over a further 12 min. Pigment separation was performed through a C8, 3 µm-column (MOS-2 HYPERSIL, Thermo Scientific, USA). The diode array detector was set at 440 nm to detect carotenoids, at 665 nm for chlorophylls and pheopigments. Pigments were identified by comparing their retention time and absorption spectra with those of pure standard pigments (DHI LAB products, Denmark). Each pigment concentration was calculated by relating the peak area of its chromatogram with the corresponding area of calibrated standard using ChemStation software (version A.10.02, Agilent technologies). In parallel with extraction, one disk per leaf was dried and weighted in order to express the pigment concentration per dry weight unit.

## 2.5. Productivity of mangrove trees

On each mangrove area, 3 nets (1 m x 1 m) were randomly positioned (1.7 m above soil to avoid contact with high tides) in order to collect leaves, flowers and fruits from mangrove trees. Net contents were sampled every two weeks, separated according to plant parts and tree species and weighted after desiccation in an air oven. The analyses focused on the leaf litter for each net. The total number of leaves (*C. tagal* and *R. mucronata* species) obtained per months were averaged by season (6 months, wet season 1 from November 2015 to May 2016, wet season 2 from November 2016 to May 2017, dry season 1 from June to October 2016, and dry season 2 from June to October 2017).

## 2.6. Monitoring of crabs

Between November 2015 and November 2017, once a month the total number of crabs and crab holes were counted within the same 4 plots (1 m x 1 m) on each area (8 areas) to calculate their densities, the Shannon diversity index and the relative abundances of crab species. The data of two successive months were averaged and the data at T1, 12, 18 and 24 months after the beginning of the experiment are presented in this study. The specific compositions of crab from each area were compared with the Bray Curtis similarity index.

## 2.7. Statistical analyses

Statistical analysis were performed using the PAST software (PAleontological STatistics, versions 2.17 and 3.06) (Hammer *et al.*, 2001). The normality was checked on each dataset with the Shapiro-Wilk test and data were transformed if needed. When data were normally distributed, two-way ANOVAs were used to test the effects of mangrove zone (*C. tagal* vs *R. mucronata*) and treatment (control vs impacted areas) per date, followed by a Tukey post-hoc test. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used with Mann-Whitney test for pairwise comparisons of non-parametric data. Data given in the text are means  $\pm$  SE. For all statistical analyses, significance was inferred at  $p < 0.05$  (noted \* if  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ ).

## 3. Results

### 3.1. Vegetation compartment

#### 3.1.1. Measurements of canopy pigmentation by NDVI

The normalized difference vegetation index (NDVI) was measured in each area of *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones at the T0 of the experiment (August 2015) and after 23 months (September 2017) (Figure 3). At all times, the values of NDVI were higher in impacted areas of *C. tagal* (C-II) and *R. mucronata* (R-II) mangrove zones than in the control areas, with in mean 21.6 and 9.6 % of increase, respectively. This long-term effect of PW discharges was almost stable during the 2 years of the study. In contrast, 23 months after the PW discharge were stopped, the increase percentage of NDVI in C-IC and R-IC areas decreased towards the values of control areas, though they remained higher, with 8.7 and 5.3 %, respectively. The rate of decrease was similar in the two mangrove zones. A partial resilience was therefore observed in C-IC and R-IC areas without the discharges of PW in both mangrove zone. On the contrary,

at T23, the increase percentage of NDVI in C-CI and R-CI areas strongly increased to reach the values of C-II and R-II areas, respectively (Figure 3).

### 3.1.2. Leaf responses

The specific leaf area (SLA) was calculated in all areas of both mangrove zones, 12 months and 19 months after the beginning of the experiment. As expected from previous results, the SLA in control areas of *C. tagal* (C-CC) and *R. mucronata* (R-CC) mangrove zones were significantly lower than the SLA in impacted areas (C-II and R-II) (Figure 4). For both mangroves zones, the SLA in C-IC and R-IC areas was significantly higher than the others areas after 12 months without PW (Figure 4). This state was only temporary since after 19 months without discharges, the SLA in C-IC and R-IC areas significantly decreased toward the SLA of respective control areas. However, in C-IC area the SLA value was still higher than in the control while in R-IC area the SLA was lower than in the control. The SLA in C-CI and R-CI areas significantly increased over time. In C-CI area the values of C-II area were reached but in R-CI area the valued remained lower than those of R-II areas.



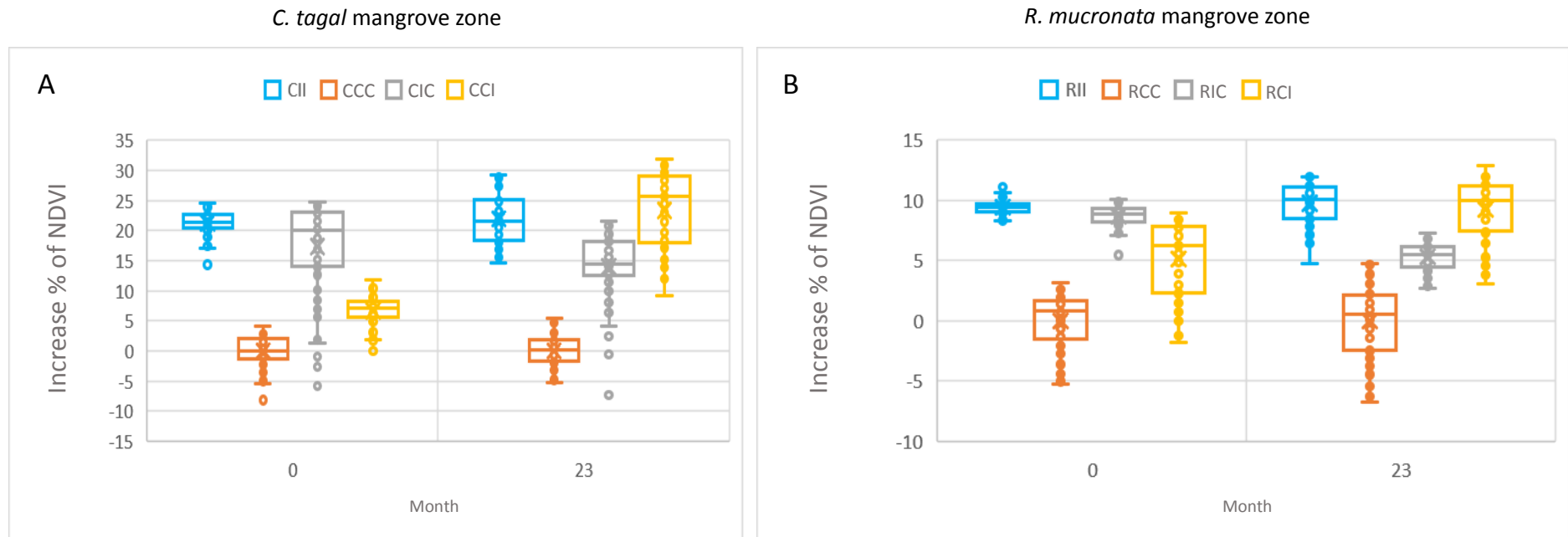


Figure 3: Increase percentage of NDVI in all areas compared to the respective control area, for *C. tagal* (A) and *R. mucronata* (B) mangrove zone.

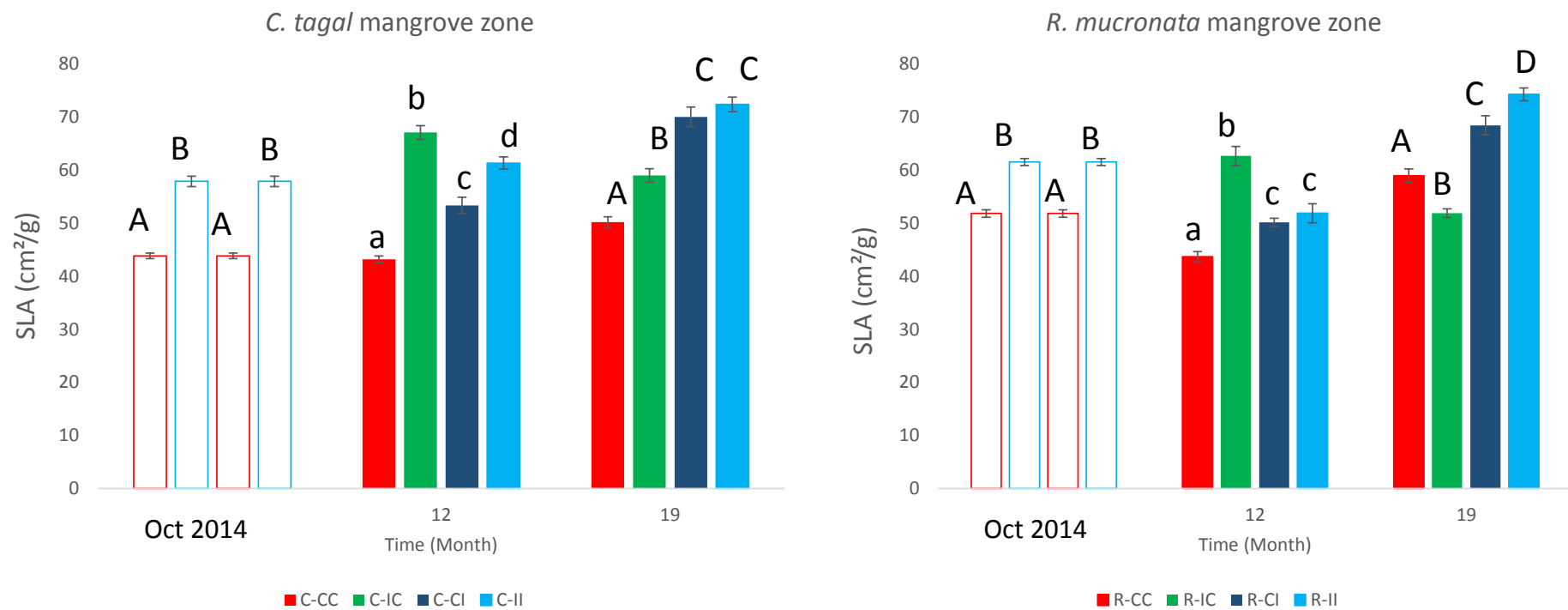


Figure 4: Specific leaf area (SLA) of each area for *C. tagal* and *R. mucronata*, in October 2014 (one year before the T0), after 12 and 19 months with PW discharge. Letters correspond to statistically homogenous groups (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis).

### 3.1.3. Photosynthetic pigment analysis

The dynamic of mature leaves pigment contents was studied 12 and 19 months after T0. The leaves from *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones were mainly composed by in mean 56 % of chlorophyll *a*, 26 % of chlorophyll *b*, 7 % of xanthophyll, 6 % of  $\beta$ -carotene, 3 % of neoxanthin and 1 % of phaeophytin *a*. The following results were focused on the four major pigments: chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, xanthophyll, and  $\beta$ -carotene. For these pigments, over time, the concentrations were significantly higher in leaves from impacted area than in control area in the *C. tagal* mangrove zone (Figure 5). Similar trends were observed in *R. mucronata* mangrove zone. In *C. tagal* mangrove zone, the chlorophyll *a* and the xanthophyll concentrations decreased in leaves from the C-IC area compared to the C-II area after 19 months (Figure 5). These results were not observed for the chlorophyll *b* and the  $\beta$ -carotene, the concentrations of these pigments remaining similar in C-IC and in C-II areas. Regarding the *R. mucronata* mangrove zone, a significant decrease of pigment concentrations (excepted for the  $\beta$ -carotene) was revealed in R-IC area after 12 months without PW discharge compared to the R-II area (Figure 5). In terms of pigment concentrations, the R-IC and the R-CC areas were no longer significantly different, indicating a resilience in R-IC area. In parallel, a significant increase of the pigment concentrations (except for the  $\beta$ -carotene) in C-CI and R-CI areas compared to the respective control areas was observed from 12 months (Figure 5).

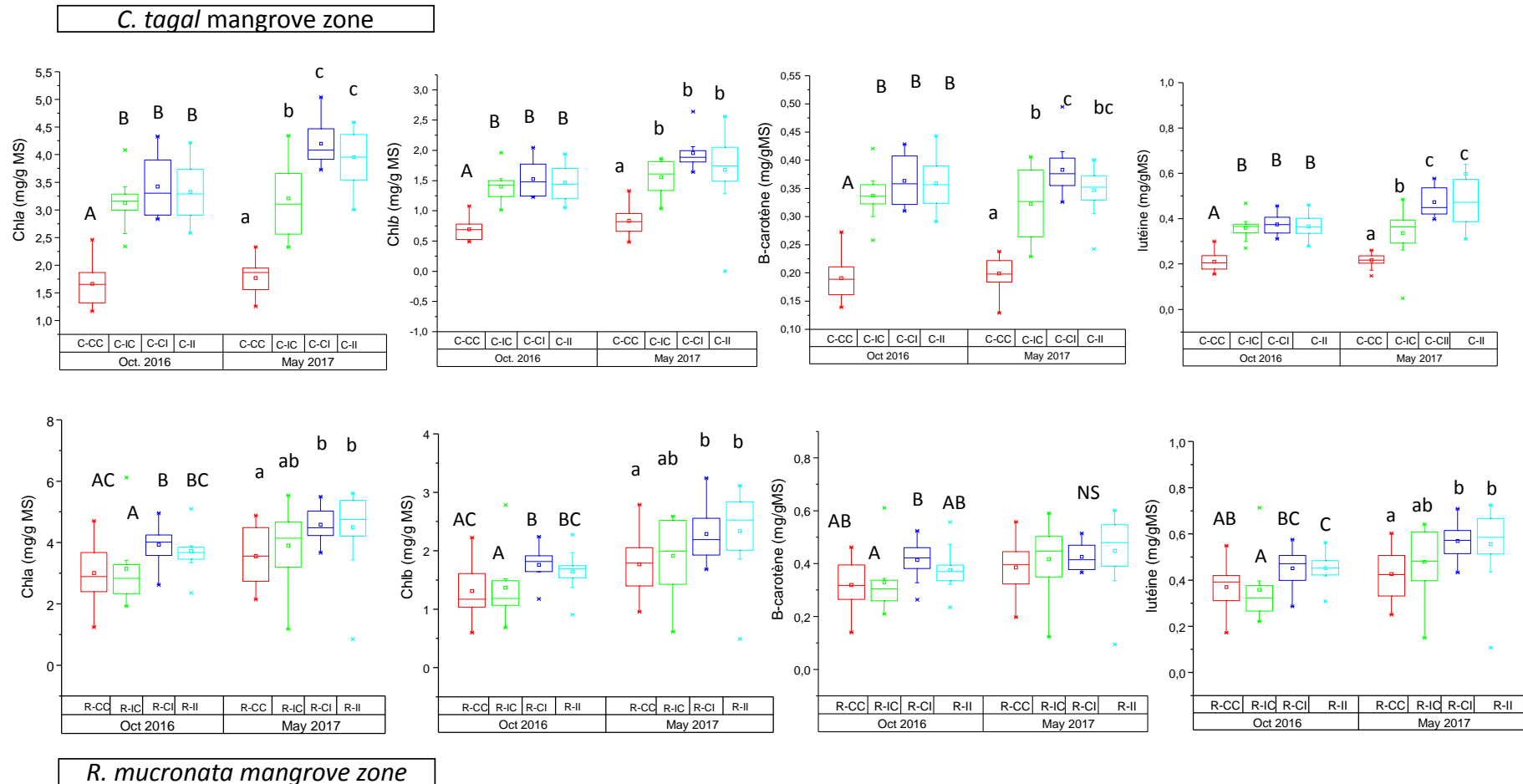


Figure 5: Pigment concentrations in all ares of *C. tagal* and *R. mucronata*, after 12 and 19 months with PW discharge. Letters correspond to statistically homogenous groups (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis).

Several ratios have been used to estimate the pigment degradation and the response of mangrove trees to environmental changes. The chlorophyll *a*: carotenoids and chlorophyll *a*: phaeophytin *a* ratios are negatively correlated to chlorophyll *a* degradation. No significant decrease of these ratios was observed in any areas of *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones compared to the control areas (C-CC and R-CC, respectively), except for the R-CI area (with chlorophyll *a*: phaeophytin *a* ratio,  $p < 0.001$  with Tuckey pairwise test). An increase of chlorophyll *b*: xanthophyll ratio is an indication of nutrient oversupply in the environment (MacFarlane and Burchett, 2001), and a decrease of the chlorophyll *a*: chlorophyll *b* ratio shows a tree adaptation to environmental changes due to an excess of nitrogen (Kitajima and Hogan, 2003). No significant modification of the chlorophyll *a*: chlorophyll *b* ratio was observed in all areas of both mangrove zones. In contrast, a significant increase of the chlorophyll *b*: xanthophyll ratio was observed only in C-CI and R-CI areas compared to respective control areas after 12 months ( $p < 0.001$  for *C. tagal* mangrove zone and  $p = 0.046$  for *R. mucronata* mangrove zone, with Tuckey pairwise test).

#### 3.1.4. Vegetation productivity

Results of vegetation productivity were focused on the total number of leaves calculated per season from November 2015 to October 2017 (Figure 6). The production of leaves was season-dependent for the *R. mucronata* mangrove zone, with a lower production during dry season, while no seasonality could be observed for the productivity in *C. tagal* mangrove zone. During the first wet season (from November 2015 to May 2016), the total production of leaves was equivalent between C-CC and C-CI areas and was significantly lower in these areas than in the C-II and C-IC areas (Figure 6). Similar trends were observed in *R. mucronata* mangrove zone. No modification of the leaf productivity was observed overtime in C-IC area compared to the C-II. In contrast, an increase of the productivity was observed over time in the C-CI area compared to the C-CC area. In the *R. mucronata* mangrove zone, the productivity in R-IC area tended to decrease observed during the second wet season (Figure 6). Besides, at this season, an increase of productivity was observed in R-CI area.

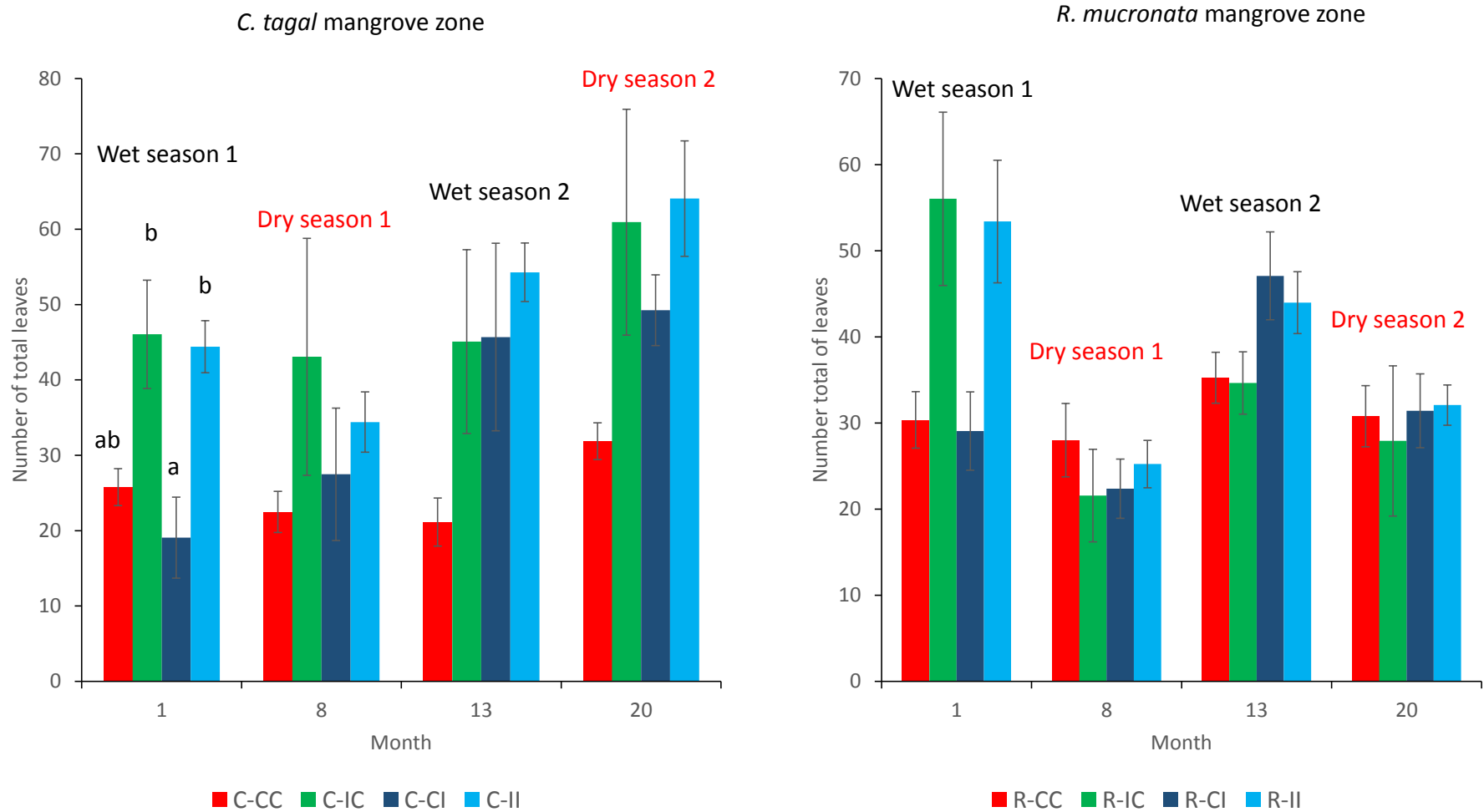


Figure 6: Total leaf productivity of mangrove areas of *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zone. The values are the mean of the total number measured during 6 months. Letters correspond to statistically homogenous groups (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis).

### 3.2. Crab community

#### 3.2.1. Density of crabs and crab holes

At the T0 of the experiment, the results showed no significant difference between control and impacted areas but the crab density in C-II and R-II impacted areas ( $8.62 \pm 0.99 \text{ ind.m}^{-2}$  for C-II and  $10.37 \pm 2.04 \text{ ind.m}^{-2}$  for R-II) were lower than in the C-CC and R-CC control areas ( $12.75 \pm 2.33 \text{ ind.m}^{-2}$  for C-CC,  $13.37 \pm 1.11 \text{ ind.m}^{-2}$  for R-CC) (Figure 7). In *C. tagal* mangrove zone, the density of crab holes was significantly higher in C-CC area ( $28.25 \pm 2.83 \text{ holes.m}^{-2}$ ) than in C-II area ( $16.37 \pm 3.55 \text{ holes.m}^{-2}$ ). For the *R. mucronata* mangrove zone, the values of crab hole density were slightly lower in impacted area ( $21 \pm 4.37 \text{ holes.m}^{-2}$ ) than in control area ( $28.5 \pm 4.24 \text{ holes.m}^{-2}$ ). The figure 7 indicates an increase of crab density overtime (slope of the line =  $m = 0.376$ ,  $R^2 = 0.9572$ ) in C-IC area. After 24 months, the density of crabs reached a higher value than in C-CC area. No significant resilience of crab density was observed in *R. mucronata* mangrove zone. Similarly, no variation was observed on the crab hole density in C-IC and R-IC areas.

After 24 months of PW discharge in *C. tagal* mangrove zone, the results showed a decrease of crab density in C-CI area ( $m = -0.458$ ,  $R^2 = 0.9601$ ,  $p = 0.0294$  between T0 and T24 with Mann-Whitney pairwise test). This decrease was significant after 18 months of PW discharge (Figure 7). The short-term impact in C-CI area was stronger than the long-term impact in C-II area, the crab density being lower in C-CI area (Figure 7). Similar results were observed in *R. mucronata* mangrove zone ( $p = 0.0268$  between T0 and T24 with Tuckey pairwise test) (Figure 7). Besides a decrease of crab density was observed in control area (R-CC). Regarding the density of crab hole, the hole number also decreased over the months in C-CI area ( $m = -0.9157$ ,  $R^2 = 0.9973$ ,  $p = 0.0304$  between T0 and T24 with Mann-Whitney pairwise test). However, the short-term impact was less important for the crab hole density than the crab density, the impact being significant after 24 months in C-CI area. The same trend was observed for *R. mucronata* mangrove zone but the PW effect was lower than in *C. tagal* mangrove zone. Besides, the density of crab hole continued to decline overtime in C-II and R-II impacted areas ( $m = -0.3681$ ,  $R^2 = 0.9312$  for C-II area,  $m = -0.4694$ ,  $R^2 = 0.9972$  for R-II area).

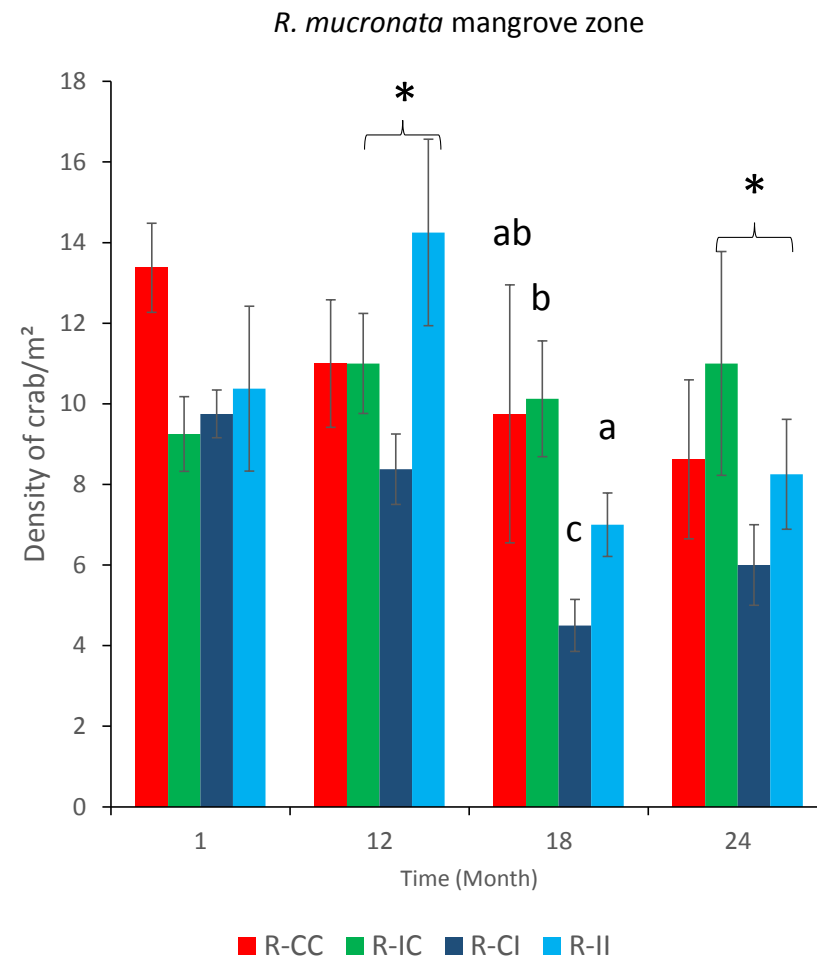
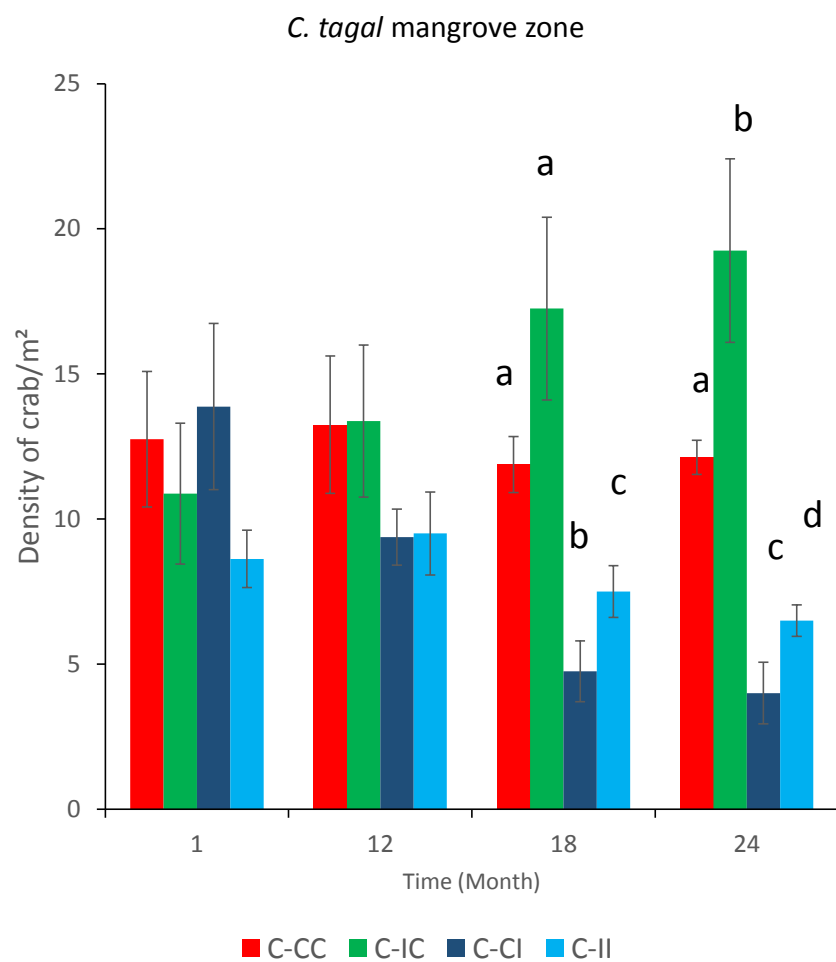


Figure 7: Dynamic of the crab density in all areas of *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zone. Letters correspond to statistically homogenous groups (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis).



### 3.2.2. Crab diversity

The  $\alpha$ -diversity of crabs, based on the Shannon diversity index, was followed between November 2015 and November 2017 in *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones (Figure 8). At the beginning of the experiment, the  $\alpha$ -diversity of crabs was significantly lower in C-II area than in C-CC area (Figure 8). Eighteen months after PW discharges were stopped, the  $\alpha$ -diversity of crab significantly increased in C-IC and R-IC areas compared to the impacted areas. The resilience was complete at 24 months in C-IC area because the crab diversity in this area was not significantly different than the C-CC control area (Figure 8). This resilience was not confirmed in R-IC area because of a new decrease of crab diversity at 24 months (Figure 8). A significant decrease of crab diversity was observed overtime in C-CI area ( $m = -0.0431$ ,  $R^2 = 0.9751$ ,  $p = 0.0294$  between T0 and T24 with Mann-Whitney pairwise test) and in R-CI area ( $m = -0.0275$ ,  $R^2 = 0.851$ ,  $p = 0.0265$  between T0 and T24 with Mann-Whitney pairwise test) from 12 months for C-CI area and 18 months for R-CI area (Figure 8). The diversity seems lower in R-CI area than in the R-II impacted area although the diversity continued to decrease in R-II area ( $p = 0.0294$  between T0 and T24 with Mann-Whitney pairwise test) (Figure 8).

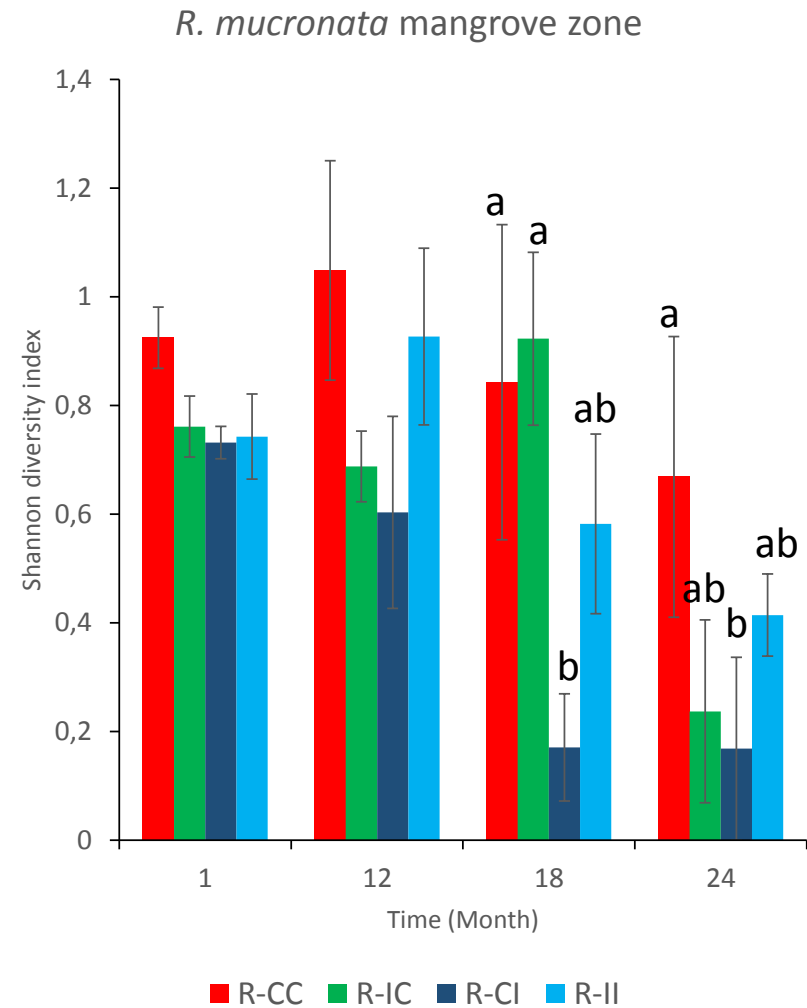
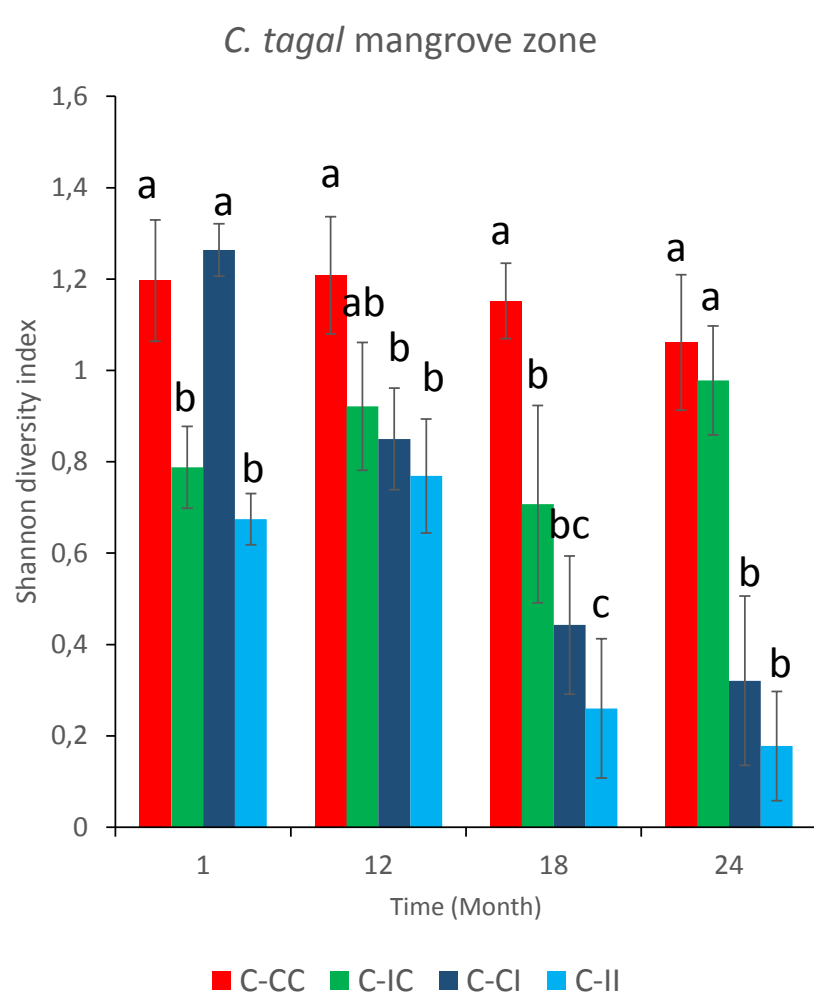


Figure 8: Shannon diversity index calculated in all areas of *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zone. Letters correspond to statistically homogenous groups (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis).

### 3.2.3. Crab specific dominance

The composition of crab species living in Malamani mangrove was described by Capdeville *et al.* (2018). The crabs belonged to two groups: the Sesarmidae, feeding on leaves and the Ocypodidae, detritivores. At T0, the Sesarmidae group was largely dominant representing in average  $52.9 \pm 11.3$  % and  $85.6 \pm 4.8$  % of individuals in C-CC and R-CC areas, respectively. This proportion was significantly higher in C-II area and equivalent in R-II area, with  $97 \pm 1.8$  % and  $88.1 \pm 8.6$  % of individuals, respectively. No resilience was observed in C-IC and R-IC areas after 24 months without PW discharge. The short-term impact of PW discharge induced a significant increase of Sesarmidae proportion from 12 months only in C-CI area, no significant effect of PW being observed in R-CI area.

The dominant crab species in Malamani mangrove areas is *Perisesarma guttatum* (Milne-Edwards, 1869), which belongs to the Sesarmidae group. As for the proportion of Sesarmidae at T0, the proportion of *P. guttatum* was significantly higher in C-II area ( $68.5 \pm 2.6$  % of individuals) than in C-CC area ( $24.4 \pm 3.8$  % of individuals) (Figure 9). No significant effect of PW discharge on *P. guttatum* proportion was observed in *R. mucronata* mangrove zone. After 24 months, the proportions of *P. guttatum* increased in impacted areas of both mangrove zones compared to the control areas ( $p = 0.0408$  for C-II area and  $p = 0.0304$  for R-II area between T0 and T24 with Mann-Whitney pairwise test) (Figure 9). A significant decrease of *P. guttatum* proportion in C-IC area compared to the C-II area showed a resilience from 18 months without PW discharge (Figure 9). The PW discharge induced an increase of *P. guttatum* proportion overtime in C-CI area compared to the C-CC area, and this was significant after 24 months of PW discharge (Figure 9). Similar trend was observed for the short-term impact in *R. mucronata* mangrove zone.

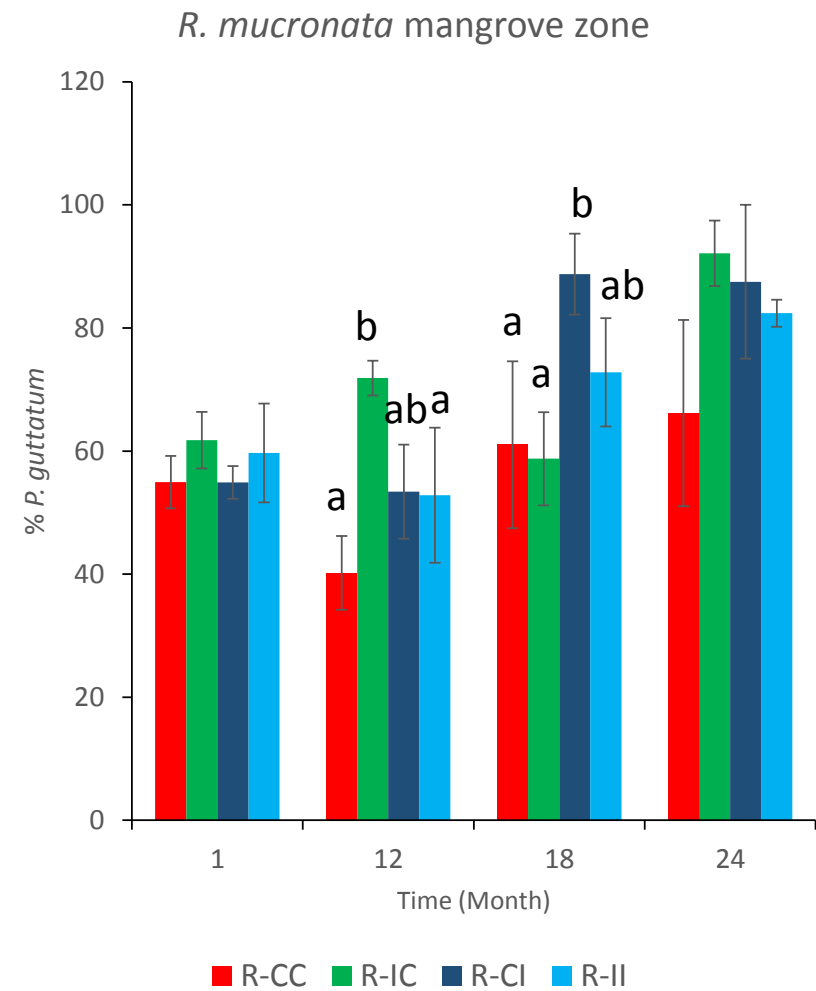
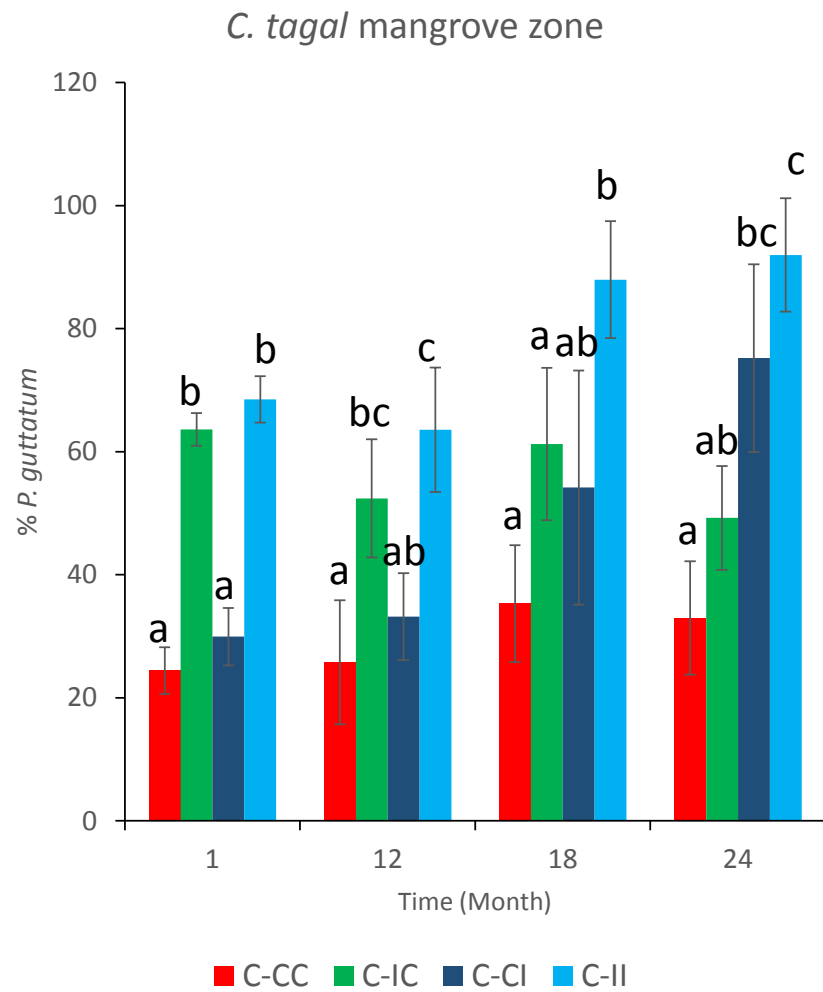


Figure 9: Measurement of *P. guttatum* proportion in all areas of *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zone. Letters correspond to statistically homogenous groups (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis).

The specific compositions of crab communities were compared overtime between all areas with the Bray-Curtis similarity index (Figure 10). The similarity between the control (C-CC and R-CC) and impacted (C-II and R-II) areas was low throughout the study from T0 to 24 months. After 6 months of PW discharge in C-CI and R-CI areas, the similarity between these areas and their respective control areas decreased overtime and conversely, the similarity between C-CI and R-CI areas and their respective impacted areas increased overtime. The short term impact was more marked in *C. tagal* mangrove zone after 19 months of PW discharge than in *R. mucronata* mangrove zone. A decrease of similarity was observed between C-IC and C-II areas, as well as an increase of similarity between C-IC and C-CC areas, which highlights a resilience of the specific composition of crab community in *C. tagal* mangrove zone, after 24 months without PW discharges. No resilience was observed in *R. mucronata* mangrove zone.

#### 4. Discussion

The present study was performed in the same experimental system studied by Herteman *et al.* (2011) in a mangrove of Mayotte Island. In this system, one area per mangrove zone received daily PW discharges since 2008 and was compared to an equivalent control area of the same zone. The mangrove areas were monitored to determine the long-term impact of the anthropic disturbance on vegetation and fauna compartments after 4.5 and 6.5 years (Capdeville *et al.*, 2018) and after 7.5 and 9.5 years of exposure (the present study), then the short-term impact after few months (0 to 24 months) of PW discharge (the present study). Finally, the discharges were stopped in several areas of both mangrove zones in October 2015, after 7.5 years of PW discharge, to assess the resilience ability of the ecosystem (the present study).

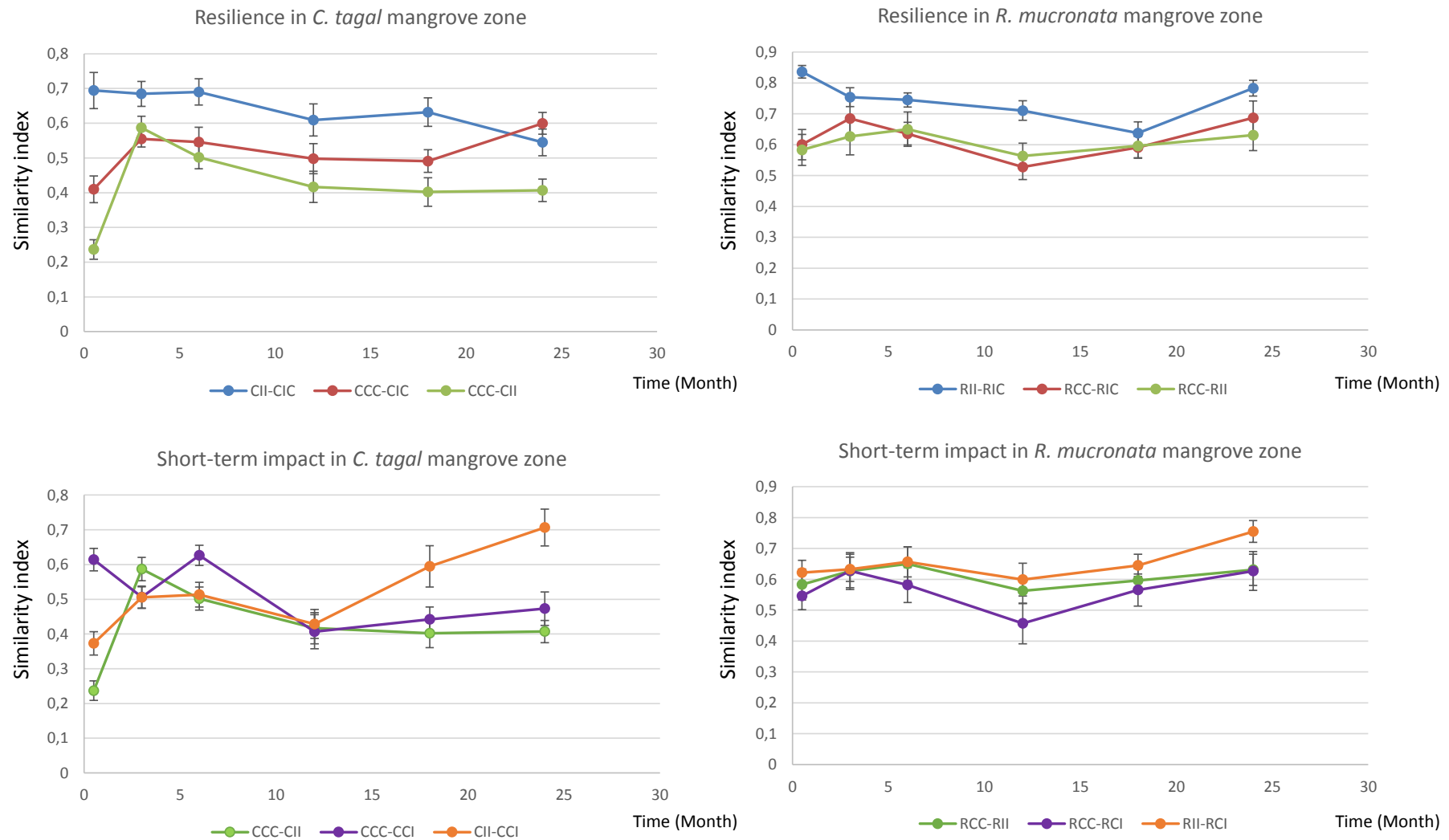


Figure 10: Dynamic of Bray-Curtis similarity index of crab community composition in *C. tagal* and *R. mucronata*

#### 4.1. Resistance capacities of the 2 mangrove zones

##### 4.1.1. Short-term impact

The macroscopic observation of mangroves through satellite photographs showed an increase of the NDVI in C-CI and R-CI areas after 23 months of PW discharge (see Figure 3). This short-term impact of PW seems to be similar in both mangrove zones. In this study, the discharges had a positive effect on NDVI unlike what can be observed with other stresses such as intensive winds and droughts which induce a mangrove tree defoliation and consequently a decrease of NDVI (Galeano *et al.*, 2017). The increase of NDVI observed here can be explained by the increase of SLA and pigment content observed for the leaves collected in C-CI and R-CI areas (Figure 4 and 5). The short-term impact significantly appeared after 19 months of exposure for the SLA and after 12 months for the pigment contents. This short-term impact was confirmed by modifications of the chlorophyll *b*: xanthophyll ratio, resulting in an excess of nutrients in C-CI and R-CI areas (MacFarlane and Burchett, 2001). This was less strong for the leaf productivity, nevertheless, an increase of the leaf litter production was observed in C-CI and R-CI areas overtime. The effect of PW was visible after more time in these areas than similar effects which were observed after only 12 months in the same mangrove areas by Herteman *et al.* (2011). In agreement with the previous observations on the site, the results of the present study showed a stronger impact of PW in the *C. tagal* mangrove zone than in the *R. mucronata* mangrove zone. This suggests that the *R. mucronata* mangrove zone would be more resistant than the *C. tagal* mangrove zone, this was contrary to our hypothesis. Nevertheless, it should be noted that the R-CC area may have been partly impacted by the PW discharges because of natural slope of the field parallel to the sea front (Figure 3). This would reduce the visible difference between R-CC and R-CI areas, suggesting a higher resistance.

The resistance capacity of crab community was also studied through the crab density, their diversity and their specific composition during 24 months. The results revealed a short-term impact of PW on crab density after 18 months of exposure and on the crab hole density after 24 months in C-CI area. Similar results were observed for *R. mucronata* mangrove zone but the PW effect was lower. Therefore, as for the vegetation compartment, the crab community seemed more resistant in the *R. mucronata* mangrove zone. The effect of PW on crab density was stronger at short term than at long-term effect, which suggests an adaptation of crabs after several years of discharges, at least in terms of density. This was not observable only in *C. tagal* mangrove zone, indicating a lower resistance of crabs in this zone. A similar stronger response

at short term than at long term was shown for the crab diversity, but in both mangrove zones. This highlights the adaptation capacity of these organisms. The crabs play an essential role on the functioning of mangrove (Kristensen, 2008). They are influenced by modifications of environmental conditions like temperature, mangrove tree species, food availability, grain size and porosity of sediments and salinity gradient (Steinke *et al.*, 1993; Frusher *et al.*, 1994). A direct effect on crabs community or an indirect effect by environmental modifications would be dramatic for mangrove functioning (Cannicci *et al.*, 2008; Lee, 2008). However, no mortality of crab was observed in presence of PW (Capdeville *et al.*, 2018), in contrast to what has been observed on crab submitted to wastewaters in mesocosms (Penha-Lopes *et al.*, 2009).

The decrease of crab diversity in *C. tagal* mangrove zones may be explained by the increase of *P. guttatum* proportion overtime. All results were in accordance with the decrease of the similarity between the C-CI area and the C-CC area and the increase of the similarity between the C-CI area and the C-II area. Similar results were observed in *R. mucronata* mangrove zone. The short-term impact was more marked in *C. tagal* mangrove zone after 19 months of PW discharge than in *R. mucronata* mangrove zone.

#### 4.1.2. Long-term impact

In a previous study, we have shown that after 6.5 years of discharges, PW induced an increase of vegetation growth, pigment content, leaf productivity, canopy closure, a modification of crab communities and a decrease of crab density and diversity (Capdeville *et al.*, 2018). After 3 more years of discharges, some parameters keep on increasing or decreasing, which indicates a worsening of the impact of PW discharges. This was the case for the SLA and for several pigment of leaves, compared to the values measured after 6.5 years, or for the density of crab holes, the crab diversity and the proportion of *P. guttatum*, compared to T0 values. This suggest that the vegetation is still responding to the anthropic disturbance, while the crab community is more and more affected.

The comparison between the dynamic of R-II and C-II areas brings contrasted results. For instance, the crab hole density decreased more on R-II area but the diversity decreased more in C-II area. This makes difficult the comparison of long-term resistance between the 2 mangrove zones.



The cited effects on vegetation resulted in a higher NDVI in C-II and R-II areas compared to the C-CC and R-CC control areas (Figure 3).

#### 4.2. Resilience capacity of the 2 mangrove zones

The resilience depends on the duration, the frequency, the intensity and the spatial extent of the disturbance (Alongi, 2008). These parameters drive the recovery regulators like the nutrient availability and the species composition (Danielson *et al.*, 2017). The ability of a community to recover relies on individual-, population- or community-level properties (Shade *et al.*, 2012). It will notably depend on the resistance of individuals, on their tolerance, on their plasticity, on the diversity of the community or on the possibilities of immigration. Species richness and evenness were shown to significantly contribute to the stability of communities (Wittebolle *et al.*, 2009). The mangrove ecosystems have demonstrated considerable resilience capacities that can be explained by a chronic exposition to natural disturbances like the fluctuations of the sea level, the temperature, the freshwater and salt exposure and the variation of the anoxia (Alongi, 2008). These disturbances contribute to the selection of resistant and tolerant species. Therefore, mangroves would have a strong potential of resilience after strong punctual disturbances such as storms, hurricanes (Danielson *et al.*, 2017), tsunamis (Alongi, 2008), intensive drought, and strong winds (Galeano *et al.*, 2017). Besides, mangroves would be more resilient than other coastal forests due to their location along bays or surrounding internal lagoons (Galeano *et al.*, 2017) which they bring a most protection against waves and wind. Besides, Smith *et al.* (2016) demonstrated that the resilience of mangrove was more effective in mangroves continuously submitted to the flooding by tides, than in intermittently closed/open lake/lagoon (ICOLL) covered by mangrove trees, which are zones less flushed by tides. But these authors showed a potential of resilience of mangrove leaves both in mangroves and in ICOLL zones after 32 years of N-wastewater exposure (Smith *et al.*, 2016). However, the resilience of mangrove submitted to anthropic pollution is poorly studied so far, most studies focusing on the response during the disturbance rather than when the disturbance is released.

The C-IC and R-IC areas were monitored to study the resilience of the two mangrove zones. After 23 months without discharge, a partial resilience was visible on the NDVI values measured in both areas, since the difference between the C-IC and R-IC areas and their corresponding control areas decreased (Figure 3). This decrease can be explained by the

increase of vegetation growth, photosynthetic pigment, and leaf area with PW. Indeed the NDVI index allow to characterize the plant cover which is correlated with the productivity of mangrove tree, the leaf area index and with the photosynthetically active biomass of canopy (Tucker, 1979). An increase of NDVI resulted that an uptake of PW with mangrove tree. Therefore the mangrove trees of *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones were able to partially remove the PW discharged. These results were consistent with leaf area measurements, for which the resilience was even since no differences could be observed with control areas after 19 months without discharge (Figure 4). Besides, the resilience was more marked in *R. mucronata* mangrove zone than in *C. tagal* mangrove zone. This phenomenon may be explained by the fact that the *R. mucronata* mangrove zone is more buffered by tides, which male it more resilient that the *C. tagal* mangrove zone. Indeed the tides allow the dilution of PW by the leaching of sediments, thus they allow an attenuation of the impact and promote the resilience on mangrove trees (Smith *et al.*, 2016). These authors showed a strong potential to remove the nitrogen from wastewaters in mangrove leaves collected in zone occasionally exposed to the tides, after 8 years without wastewaters, but this resilience capacity was lower without the tides than in zone continuously exposed to the tides (Smith *et al.*, 2016).

Surprisingly, the resilience was less marked for the pigment concentration analyzes. The resilience was only observed for the chlorophyll *a* and the xanthophyll concentrations in *C. tagal* mangrove zone, and seemed to be faster in *R. mucronata* mangrove zone (figure 5). Similarly, no resilience was observed on the leaf productivity in *C. tagal* mangrove zone after 24 months without PW discharge, while a tendency was observed in *R. mucronata* mangrove zone (figure 6). This indicates a delay in the response of these parameters, which may simply be linked to the tree physiology. In the present case, satellite imaging and NDVI measurement seemed to be the more sensitive way to assess vegetation resilience.

The resilience capacities were also evaluated for crab communities. An increase of crab density, higher than in control area, was observed in C-IC of *C. tagal* mangrove zone suggesting a resilience of the crab community after 18 months without discharge (figure 7). No significant resilience of crab density was observed in *R. mucronata* mangrove zone. Similarly, no resilience was observed on the crab hole density in C-IC and R-IC areas even after 24 months. The evolution of crab density may be influenced by the density of crab hole. In 2014, Capdeville *et al.* (2018) showed no significant effect of PW on crab density in impacted area of *C. tagal* mangrove zone, resulted by a similar number of crab holes in control and impacted areas of this mangrove zone. Nevertheless, the PW had a significant effect on the crab density, indeed there

is a lower number of crab hole in impacted area of *R. mucronata* mangrove zone than in control area. In the present study, after 24 months without PW discharge, a strong resilience was observed on crab density in *C. tagal* mangrove zone, the number of crab increased in C-IC area toward the number of crab in C-CC control area, while the number was unmodified in *R. mucronata* mangrove zone. The strong potential of resilience in *C. tagal* mangrove zone may be explained by the lower effect of PW on density of crab hole. The recolonization by crabs in C-IC area after the end of the perturbation could be promoted by a habitat less impacted when the area was exposed to the PW before the T0 of the experimentation. Regarding the *R. mucronata* mangrove zone, the resilience was not visible on crab density in R-IC area, this may be explained by an absence of resilience on the density of crab hole which decreased when the R-IC was still exposed to the PW before T0. Besides, the resilience of crab diversity was significant only in C-IC of *C. tagal* mangrove zone after 18 months without discharge. This cannot be explained by a modification of food sources because the leaf productivity did not change without discharge, nor because a change of mangrove tree species and state of canopy closure.

Surprisingly, the resilience was efficient on crab diversity in C-IC area of *C. tagal* mangrove zone but no resilience was observed on the Sesarmidae and Ocypodidae proportions. The Sesarmidae group remains the dominant crab group. But the dominant crab species belonging at the Sesarmidae group, the *P. guttatum* proportion reached to initial state after 18 months. All results were confirmed with the increase of the similarity between the C-IC area and the control area indicating the resilience of the specific composition after 24 months in *C. tagal* mangrove zone. But no resilience was observed in *R. mucronata* mangrove zone.

## 5. Conclusion

The results of vegetation monitoring revealed that the *R. mucronata* mangrove zone would be more resilient than the *C. tagal* mangrove zone. However for the results on crab community, the resilience was significant after 24 months without PW discharge only in *C. tagal* mangrove zone. The hypothesis that the *C. tagal* mangrove zone would be more resilient because this zone was more submitted to strong environmental variations was accepted. These variations could induce selection of species more tolerant and resistant in *C. tagal* mangrove zone. Besides, this mangrove zone was closer than open areas favoring the recolonization of crabs more rapidly

than in *R. mucronata* mangrove zone. Two years are not sufficient to see the resilience of crab community in *R. mucronata* mangrove zone. Concerning the study of short-term impact, it would be stronger in *C. tagal* mangrove zone than in *R. mucronata* mangrove zone. Although the impact of PW was visible in *R. mucronata* mangrove, this mangrove zone would be more resistant. This can be explained by the stronger exposure of tides in this mangrove zone. To our knowledge, this is the first time that a study combines the following of the short-term and the long-term impact, and the resilience on mangrove trees and crabs exposed or not to PW discharge.

## 6. Acknowledgements

We are grateful to the Water Syndicate of Mayotte (SIEAM) for the maintenance of the experimental system, the coastal conservatory of Mayotte for the study site, and Eliott Sucre from University center of Mayotte for his researches on crabs of Mayotte. This work was supported by the Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA, grant n°2014/03) and the SIEAM (agreement with CNRS n°111098).

## 7. Bibliographic references

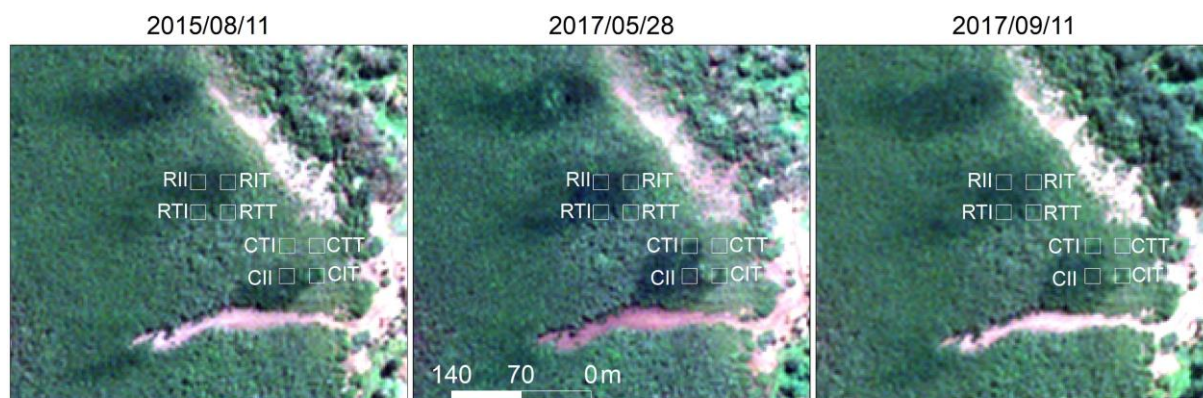
- Aburto-Oropeza, O., Ezcurra, E., Danemann, G., Valdez, V., Murray, J., Sala, E., 2008. Mangroves in the Gulf of California increase fishery yields. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 10456–10459. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804601105>
- Alongi, D.M., 2012. Carbon sequestration in mangrove forests. *Carbon Manag.* 3, 313–322. <https://doi.org/10.4155/cmt.12.20>
- Alongi, D.M., 2008. Mangrove forests: Resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate change. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 76, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.08.024>
- Alongi, D.M., 2002. Present state and future of the world's mangrove forests. *Environ. Conserv.* 29, 331–349. <https://doi.org/10.1017/S0376892902000231>
- Ball, M., 1998. Mangrove species richness in relation to salinity and waterlogging: a case study along the Adelaide River floodplain, Northern Australia. *Glob. Ecol. Biogeogr. Lett.* 7, 73–82. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.1998.00282.x>
- Barlow, R.G., Cummings, D.G., Gibb, S.W., 1997. Improved resolution of mono- and divinyl chlorophylls a and b and zeaxanthin and lutein in phytoplankton extracts using reverse phase C-8 HPLC. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 161, 303–307. <https://doi.org/10.3354/meps161303>
- Bartolini, F., Cimò, F., Fusi, M., Dahdouh-Guebas, F., Lopes, G.P., Cannicci, S., 2011. The effect of sewage discharge on the ecosystem engineering activities of two East African fiddler crab species: Consequences for mangrove ecosystem functioning. *Mar. Environ. Res.* 71, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2010.10.002>
- Blasco, F., 1991. LES MANGROVES. *La Recherche* 444–453.

- Boto, K.G., Wellington, J.T., 1984. Soil characteristics and nutrient status in a Northern Australian mangrove forest. *Estuaries* 7, 61–69. <https://doi.org/10.2307/1351957>
- Botto, F., Iribarne, O., Gutierrez, J., Bava, J., Gagliardini, A., Valiela, I., 2006. Ecological importance of passive deposition of organic matter into burrows of the SW Atlantic crab *Chasmagnathus granulatus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 312, 201–210.
- Camilleri, J.C., 1992. Leaf-litter processing by invertebrates in a mangrove forest in Queensland. *Mar. Biol.* 114, 139–145. <https://doi.org/10.1007/BF00350863>
- Cannicci, S., Burrows, D., Fratini, S., Smith III, T.J., Offenberg, J., Dahdouh-Guebas, F., 2008. Faunal impact on vegetation structure and ecosystem function in mangrove forests: A review. *Aquat. Bot., Mangrove Ecology – Applications in Forestry and Costal Zone Management* 89, 186–200. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2008.01.009>
- Capdeville, C., Abdallah, K., Buffan-Dubau, E., Lin, C., Azemar, F., Lambs, L., Fromard, F., Rols, J.-L., Leflaive, J., 2018. Limited impact of several years of pretreated wastewater discharge on fauna and vegetation in a mangrove ecosystem. *Mar. Pollut. Bull.* in press.
- Danielson, T.M., Rivera-Monroy, V.H., Castañeda-Moya, E., Briceño, H., Travieso, R., Marx, B.D., Gaiser, E., Farfán, L.M., 2017. Assessment of Everglades mangrove forest resilience: Implications for above-ground net primary productivity and carbon dynamics. *For. Ecol. Manag.* 404, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.08.009>
- Donato, D.C., Kauffman, J.B., Murdiyarso, D., Kurnianto, S., Stidham, M., Kanninen, M., 2011. Mangroves among the most carbon-rich forests in the tropics. *Nat. Geosci.* 4, 293–297. <https://doi.org/10.1038/ngeo1123>
- Duke, N.C., 2016. Oil spill impacts on mangroves: Recommendations for operational planning and action based on a global review. *Mar. Pollut. Bull., Turning the tide on mangrove loss* 109, 700–715. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.082>
- Ewel, K., Twilley, R., Ong, J., 1998. Different kinds of mangrove forests provide different goods and services. *Glob. Ecol. Biogeogr. Lett.* 7, 83–94. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.1998.00275.x>
- Feller, I.C., Lovelock, C.E., Berger, U., McKee, K.L., Joye, S.B., Ball, M.C., 2010. Biocomplexity in mangrove ecosystems. *Annu. Review Mar. Sci.* 2, 395–417.
- Frusher, S.D., Giddins, R.L., Smith, T.J., 1994. Distribution and abundance of grapsid crabs (Grapsidae) in a mangrove estuary: effects of sediment characteristics, salinity tolerances, and osmoregulatory ability. *Estuaries Coasts* 17, 647–654.
- Galeano, A., Urrego, L.E., Botero, V., Bernal, G., 2017. Mangrove resilience to climate extreme events in a Colombian Caribbean Island. *Wetl. Ecol. Manag.* 25, 743–760. <https://doi.org/10.1007/s11273-017-9548-9>
- Giri, C., Ochieng, E., Tieszen, L.L., Zhu, Z., Singh, A., Loveland, T., Masek, J., Duke, N., 2011. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 20, 154–159. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2010.00584.x>
- Gutiérrez, J.L., Jones, C.G., Groffman, P.M., Findlay, S.E.G., Iribarne, O.O., Ribeiro, P.D., Bruschetti, C.M., 2006. The contribution of crab burrow excavation to carbon availability in surficial salt-marsh sediments. *Ecosystems* 9, 647–658. <https://doi.org/10.1007/s10021-006-0135-9>
- Hamilton, S.E., Casey, D., 2016. Creation of a high spatio-temporal resolution global database of continuous mangrove forest cover for the 21st century (CGMFC-21). *Glob. Ecol. Biogeogr.* 25, 729–738. <https://doi.org/10.1111/geb.12449>

- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron.* 4, 1–9.
- Herteman, M., Fromard, F., Lambs, L., 2011. Effects of pretreated domestic wastewater supplies on leaf pigment content, photosynthesis rate and growth of mangrove trees: A field study from Mayotte Island, SW Indian Ocean. *Ecol. Eng.* 37, 1283–1291. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.03.027>
- Jones, C.G., Lawton, J.H., Shachak, M., 1994. Organisms as ecosystem engineers, in: *Ecosystem Management*. Springer, pp. 130–147.
- Kitajima, K., Hogan, K.P., 2003. Increases of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. *Plant Cell Environ.* 26, 857–865. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01017.x>
- Komiyama, A., Havanond, S., Srisawatt, W., Mochida, Y., Fujimoto, K., Ohnishi, T., Ishihara, S., Miyagi, T., 2000. Top/root biomass ratio of a secondary mangrove (*Ceriops tagal* (Perr.) C.B. Rob.) forest. *For. Ecol. Manag.* 139, 127–134. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(99\)00339-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(99)00339-4)
- Komiyama, A., Ong, J.E., Pongparn, S., 2008. Allometry, biomass, and productivity of mangrove forests: A review. *Aquat. Bot.* 89, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.12.006>
- Kristensen, E., 2008. Mangrove crabs as ecosystem engineers; with emphasis on sediment processes. *J. Sea Res.* 59, 30–43.
- Lee, S.Y., 2008. Mangrove macrobenthos: assemblages, services, and linkages. *J. Sea Res.* 59, 16–29.
- Lee, S.Y., 1998. Ecological role of grapsid crabs in mangrove ecosystems: a review. *Mar. Freshw. Res.* 49, 335–343. <https://doi.org/10.1071/mf97179>
- Lee, S.Y., Primavera, J.H., Dahdouh-Guebas, F., McKee, K., Bosire, J.O., Cannicci, S., Diele, K., Fromard, F., Koedam, N., Marchand, C., Mendelssohn, I., Mukherjee, N., Record, S., 2014. Ecological role and services of tropical mangrove ecosystems: a reassessment. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 23, 726–743. <https://doi.org/10.1111/geb.12155>
- Lewis, M., Pryor, R., Wilking, L., 2011. Fate and effects of anthropogenic chemicals in mangrove ecosystems: A review. *Environ. Pollut.* 159, 2328–2346. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.027>
- MacFarlane, G.R., Burchett, M.D., 2001. Photosynthetic Pigments and Peroxidase Activity as Indicators of Heavy Metal Stress in the Grey Mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 233–240. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(00\)00147-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00147-8)
- Mohamed, M.O.S., Mangion, P., Mwangi, S., Kairo, J.G., Dahdouh-Guebas, F., Koedam, N., 2016. Are Peri-Urban Mangroves Vulnerable? An Assessment Through Litter Fall Studies, in: *Estuaries: A Lifeline of Ecosystem Services in the Western Indian Ocean, Estuaries of the World*. Springer, Cham, pp. 39–51. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-25370-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25370-1_3)
- Molnar, N., Welsh, D.T., Marchand, C., Deborde, J., Meziane, T., 2013. Impacts of shrimp farm effluent on water quality, benthic metabolism and N-dynamics in a mangrove forest (New Caledonia). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 117, 12–21.
- Penha-Lopes, G., Bartolini, F., Limbu, S., Cannicci, S., Kristensen, E., Paula, J., 2009. Are fiddler crabs potentially useful ecosystem engineers in mangrove wastewater wetlands? *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1694–1703. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.06.015>
- Pimm, S.L., 1984. The complexity and stability of ecosystems. *Nature* 307, 321–326. <https://doi.org/10.1038/307321a0>

- Prasad, M.B.K., 2012. Nutrient stoichiometry and eutrophication in Indian mangroves. *Environ. Earth Sci.* 67, 293–299. <https://doi.org/10.1007/s12665-011-1508-8>
- Robertson, A.A., Alongi, D.D., others, 1992. *Tropical Mangrove Ecosystems*. Coastal and Estuarine Studies. 41. American Geophysical Union.
- Shade, A., Peter, H., Allison, S.D., Baho, D.L., Berga, M., Bürgmann, H., Huber, D.H., Langenheder, S., Lennon, J.T., Martiny, J.B., others, 2012. Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Front. Microbiol.* 3.
- Smith, P.E., Oakes, J.M., Eyre, B.D., 2016. Recovery of nitrogen stable isotope signatures in the food web of an intermittently open estuary following removal of wastewater loads. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 182, 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.10.003>
- Smith, T.J., Boto, K.G., Frusher, S.D., Giddins, R.L., 1991. Keystone species and mangrove forest dynamics: the influence of burrowing by crabs on soil nutrient status and forest productivity. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 33, 419–432. [https://doi.org/10.1016/0272-7714\(91\)90081-L](https://doi.org/10.1016/0272-7714(91)90081-L)
- Spalding, M., Blasco, F., Field, C., 1997. *World mangrove atlas.*, Biodiversity. International Society for Mangrove Ecosystems.
- Spalding, M., Kainuma, M., Collins, L., 2010. *World Atlas of Mangroves*, 2nd edition. ed. Earthscan.
- Steinke, T.D., Rajh, A., Holland, A.J., 1993. The feeding behaviour of the red mangrove crab *Sesarma meinerti* De Man, 1887 (Crustacea: Decapoda: Grapsidae) and its effect on the degradation of mangrove leaf litter. *South Afr. J. Mar. Sci.* 13, 151–160.
- Thom, B.G., Snedaker, S., Snedaker, J., 1984. The mangrove ecosystem: research methods. *Mangrove Ecosyst. Res. Methods Monogr. Oceanogr. Methodol.* 3–15.
- Tomlinson, P.B., 2016. *The Botany of Mangroves*. Cambridge University Press.
- Tucker, C.J., 1979. Red and photographic infrared linear combinations for monitoring vegetation. *Remote Sens. Environ.* 8, 127–150.
- Wang, M., Zhang, J., Tu, Z., Gao, X., Wang, W., 2010. Maintenance of estuarine water quality by mangroves occurs during flood periods: A case study of a subtropical mangrove wetland. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 2154–2160. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.07.025>
- Wittebolle, L., Marzorati, M., Clement, L., Balloi, A., Daffonchio, D., Heylen, K., De Vos, P., Verstraete, W., Boon, N., 2009. Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature* 458, 623–626. <https://doi.org/10.1038/nature07840>
- Zhang, Z.-W., Xu, X.-R., Sun, Y.-X., Yu, S., Chen, Y.-S., Peng, J.-X., 2014. Heavy metal and organic contaminants in mangrove ecosystems of China: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 11938–11950. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3100-8>

## Supplementary files



**Figure S1:** Satelite photographs indicating the location of studied mangrove area location in the study site. The more intense green coloring of vegetation revealed the PW effect on vegetation.



**Chapitre 6 : Dynamiques de réponse  
résistance/résilience de la communauté microbienne  
d'une mangrove**



Ce chapitre fait l'objet d'un article scientifique en préparation intitulé :

Resistance and resilience of microbial communities in mangrove sediments exposed to anthropic disturbance

Suite au chapitre 5, nous avons mis en évidence des capacités de résistance et de résilience des compartiments végétation et crabes, avec des réponses différentes selon le faciès de mangrove. Le chapitre 3 avait révélé le potentiel de résistance à long terme des communautés microbiennes suite à un rejet d'EUD appliqué durant 5 ans. Dans le chapitre 6, nous tentons de caractériser la résistance de la microflore des sédiments à court terme (sur 19 mois) ainsi que sa capacité de résilience après l'arrêt des rejets d'EUD faisant suite à une application de 7 ans. Nous avons pu également poursuivre le suivi à long terme des communautés microbiennes grâce au maintien du rejet sur la parcelle impactée depuis 2008, soit après une application de 9 ans.

Les plus grandes variations cycliques des conditions environnementales, notamment de la salinité et de l'humidité, dans la zone dominée par *Ceriops tagal* devraient favoriser la sélection d'espèces tolérantes ou résistantes aux perturbations. Notre hypothèse est donc que la résilience des communautés microbiennes devrait être plus rapide dans cette zone.

Les communautés microbiennes des sédiments ont été prélevées dans des placettes (4 m<sup>2</sup>, voir **Figure 24** dans le chapitre 5) positionnées sur les parcelles de mangrove définies dans le chapitre 5. Les communautés ont donc été suivies dans 4 parcelles par faciès de mangrove : I – I, I – T, T – T, et T – I (voir **Figure 20**, dans le chapitre 2). Dans cette étude, nous avons ciblé les expérimentations sur les communautés bactériennes totales par des analyses du gène codant pour l'ADNr 16S par PCR quantitative, les communautés microbiennes photosynthétiques par la quantification des pigments présents à la surface des sédiments et sur les communautés fonctionnelles participant à la dénitrification (bactéries dénitrifiantes, gène *nosZ* clade I) et à la nitrification (AOA et AOB par le gène *amoA*). L'activité de dénitrification potentielle a également été mesurée.

Les résultats de ce chapitre ont montré que l'impact à court terme était plus rapide sur les communautés microbiennes (après 8 ou 12 mois) que sur la végétation et les crabes (après 12 à 24 mois). Les EUD ont induit une modification de la structure des microorganismes phototrophes, une stimulation des densités bactériennes après 12 mois, ainsi qu'une augmentation de l'activité potentielle après 8 mois d'exposition. Ces effets étaient plus marqués

dans le faciès *C. tagal*. Le même type de réponse a été observé pour le maintien de la perturbation à long terme (après 9 ans), ce qui est en contradiction avec les résultats du chapitre 3 analysés après 5 ans d'exposition aux EUD. L'étude de la composition élémentaire des sédiments (C, N et P) a montré une grande stabilité des proportions de ces éléments, que ce soit en présence ou absence d'EUD.

Cette étude a contredit notre hypothèse en montrant de plus fortes capacités de résistance et de résilience des communautés microbiennes pour le faciès *R. mucronata* après une perturbation anthropique à court ou long terme. Bien que l'impact des rejets fût plus marqué dans le faciès *C. tagal*, aucun dysfonctionnement de l'écosystème mangrove n'y a été observé.

#### *Difficultés rencontrés lors des expérimentations :*

En étape préliminaire, nous avons tenté de cibler le second type de bactéries dénitrifiantes par l'analyse du gène *nosZ* clade II. Nous avons réussi à obtenir un standard spécifique, portant ce gène, pour des quantifications de bactéries dénitrifiantes par PCR-Q, mais il s'est avéré inutilisable. Nous avons également tenté de cibler les bactéries participant à l'anammox, mais nous n'avons pas réussi à amplifier leur ADN. Nous avons souhaité mesurer les activités de nitrification potentielle, de dénitrification et d'anammox *in situ* (isotope pairing method) mais sans succès. Le sel contenu dans les sédiments a perturbé la colonne pour les analyses en chromatographie gazeuse, ne permettant pas l'exploitation des résultats.

La méthode d'isotopie pairing consiste à suivre les flux d'azote conduisant à la formation de diazote (dénitrification et anammox). Elle implique l'utilisation de l'isotope stable du nitrate, le  $^{15}\text{NO}_3^-$ . Cet isotope rentre dans les processus et forme du diazote marqué. Cette expérimentation a demandé des incubations sur le terrain très lourdes et le respect de conditions d'anoxie dans les échantillons. Les quantités de diazote marqué sont ensuite mesurées au spectromètre de masse couplé à une chromatographie gazeuse. Les premiers essais ont confirmé les résultats pour l'activité de dénitrification potentielle. Ne pouvant pas mesurer l'ammonium des sédiments, donc l'anammox, les échantillons n'ont pas pu être exploités.

De plus, nos résultats se sont basés sur la quantification des communautés fonctionnelles par le ciblage des ADN bactériens. Or ces mesures ne nous permettent pas de déterminer la proportion de microorganismes actifs dans les processus de l'azote. Nous avons tenté de quantifier les bactéries actives par le suivi du transcrit des gènes considérés par RT-QPCR, mais

l'expérimentation n'a pas abouti, du fait de problèmes associés à la conservation et au transport des échantillons d'ARN entre Mayotte et Toulouse.

# Resistance and resilience of microbial communities in mangrove sediments exposed to anthropic disturbance

Capdeville Cécile<sup>a\*</sup>, Pommier Thomas<sup>b</sup>, Gervais Jonathan<sup>b</sup>, Fromard François<sup>a</sup>, Rols Jean-Luc<sup>a</sup>, Leflaive Joséphine<sup>a</sup>

<sup>a</sup>EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France

<sup>b</sup>Ecologie Microbienne, INRA, UMR 1418, CNRS, UMR 5557, Université Lyon 1, Villeurbanne, France

\*Corresponding author: [Josephine.leflaive@univ-tlse3.fr](mailto:Josephine.leflaive@univ-tlse3.fr)

## Abstract:

Mangrove forests are coastal ecosystems continuously affected by various environmental stresses and anthropogenic pressures. The aim of this study was to evaluate the resistance and resilience properties of microbial communities in mangrove sediments exposed to some of these anthropogenic pressures, in function of the level and type of natural stress they are subjected to. Our hypothesis is that communities in zones subjected to higher environmental variations where the environmental conditions apply higher selective pressure, will be more stable.

We used an in situ experimental system set up in Mayotte Island where mangroves are exposed since 2008 to pretreated wastewater (PW) discharges. This field experiment aims at testing mangrove as a filter for nutrients and organic matter between land and lagoon. PW are daily discharged into two mangrove zones, dominated by the mangrove trees *Rhizophora mucronata* or *Ceriops tagal*, the *C. tagal* mangrove zone being the most submitted to environmental fluctuations. For each mangrove zone, 3 areas (225 m<sup>2</sup>) were exposed to PW either for several years or since the beginning of the present study or never exposed (control). In one additional area PW discharge has been stopped after 7.5 years to assess the resilience capacities of microbial communities. Sediments have been sampled after 1, 3, 8, 12 and 19 months in 4 plots per area. Since wastewaters contained mainly ammonium, we focused on communities involved in N-cycle. Microorganisms densities have been estimated by qPCR and the denitrification activity (DEA) evaluated by potential activity measurements. The composition of microbial

photosynthetic communities at sediment surface was assessed by HPLC. Sediment elementary composition was also determined.

Long-term WD significantly modified the structure of phototrophic communities and increased the DEA and the density of microorganisms involved in N-cycle in both mangrove zones. The resilience of microbial communities and their activities, observed after 8 months, seemed to be faster on the *R. mucronata* mangrove zone. Regarding the accumulation of N and P in sediments, the proportion stability was faster to reach. The microbial communities seem to be more resistant and resilient in *R. mucronata* mangrove zone, which is contrary to the suggested the hypothesis.

**Keywords:** Mangrove ecosystem; natural environmental stress; wastewater discharge; *in situ* long term monitoring; microbial community; N-cycle.

## 1. Introduction

Mangrove forests are coastal ecosystems of tropical and subtropical areas, continuously under tidal influence (Blasco, 1991; Spalding et al., 1997) and submitted to environmental pressures (salinity gradients, tidal cycle, sediment anoxia, soil instability, alternating seasons, temperature) (Feller et al., 2010). These overall nutrient-poor forests (Boto and Wellington, 1984) are highly productive systems (Alongi, 2002). They provide varied food and material resources to human society and marine communities (Giri et al., 2011; Lee et al., 2014) and they are the main source of organic matter for the coastal marine food webs (Komiyama et al., 2000; Mohamed et al., 2016). They have also a high potential of carbon sequestration and storage due to rapid rates of net primary production and sedimentation (Komiyama et al., 2008; Donato et al., 2011; Alongi, 2012).

The microorganisms of mangrove sediments allow the degradation of organic matter from vegetative materials (Holguin et al., 2001) and play a crucial role in nutrient cycles, particularly in nitrogen and phosphorous cycles (Alvarenga et al., 2015). They contribute to the removal of nutrients, particularly the nitrogen, and organic matter from sediments (Wu et al., 2008; Tam et al., 2009). In association with the mangrove trees, they can actively participate to the epuration of wastewaters from urban centers and aquatic farms (Wong et al., 1995). Sediment surface also is partially covered with phototrophic and heterotrophic microorganisms embedded into a matrix of extracellular polymeric substances (Decho, 2000) which participate to sediment

stabilization against resuspension, plant growth promotion (Bouchez et al., 2013), and to the chelation of toxic metals and other contaminants (Decho, 2000). Phototrophic microorganisms such as diatoms, green algae or cyanobacteria contribute to the primary production of the ecosystem and constitute a food source for heterotrophic protists and meiofauna (Bertrand et al., 2011).

The main functions of microorganisms involved in nitrogen cycle in mangrove ecosystem are realized through different metabolic processes: nitrogen ( $N_2$ ) fixation, nitrification, denitrification, ammonification, anaerobic ammonium oxidation (anammox) and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) (Alongi et al., 1992; Ramachandran et al., 2008). These microorganisms participate to the degradation of organic nitrogen into inorganic nitrogen compounds (Alongi et al., 1992), available for the trophic chain, notably for the mangrove trees (Ganguly et al., 2009). For example, the diazotroph carrying out the  $N_2$ -fixation use the nitrogenase reductase gene (*nifH*) (Levy-Booth et al., 2014) to transform the  $N_2$  into ammonium ( $NH_4^+$ ) in mangrove sediments (Dias et al., 2012) and promote the mangrove tree growth (Alongi, 2009). Aerobic ammonia oxidizing bacteria (AOB) and archaea (AOA) were detected in mangroves by the quantification of *amoA* gene encoding for the ammonia monooxygenase enzyme (Li et al., 2011), which catalyzes the nitrate ( $NO_3^-$ ) formation by nitrification (Alongi et al., 1992). Nitrogen can be removed from the sediments under the gaseous forms ( $N_2$ , NO,  $N_2O$ ) by the denitrification and anammox processes carried out by denitrifying bacteria and anammox bacteria, respectively (Levy-Booth et al., 2014). These anaerobic processes were detected in mangroves sediments by the investigation of genes encoding for the nitrite reductase (*nirK*) and nitrous oxide reductase (*nosZ*) for denitrification (Fernandes et al., 2012) and by genes encoding for the hydrazine oxidoreductase (*hzor*) and the hydrazine synthase (*hzsA*) for anammox (Li and Gu, 2013). The release of  $N_2$  from mangrove sediments seems to be more important by denitrification than anammox processes (Fernandes et al., 2012).

Microorganisms in mangrove sediments are directly exposed to anthropogenic pollutants that accumulate in sediments, such as organic contaminants (Zhang et al., 2014), oil spills (Muangchinda et al., 2013), domestic or industrial wastewaters (Bouchez et al., 2013; Tam, 1998). Resistance of microbial communities to disturbances is favored by their high metabolic flexibility, good physiological tolerance to environmental changes and short generation time (Fenchel and Finlay, 2004). However, structural modifications of the microbial communities can result from these anthropogenic inputs whether they are diffuse (Cao et al., 2011; Chakraborty et al., 2015; Fernandes et al., 2014) or controlled, as nutrient input (Li and Gu,



2013) or wastewater discharge (Tam, 1998). For example, Tam (1998) reported a higher density of aerobic and anaerobic heterotrophic bacteria, nitrifying and denitrifying bacteria in microcosms receiving wastewaters. Similar results were reported in mangroves exposed to domestic wastewater discharges with an increase of the relative abundance of microorganisms involved in N-cycle and phototrophs (Bouchez et al., 2013; Tam et al., 2009; Wickramasinghe et al., 2009). But no effect of wastewaters on the structure of these microbial communities was observed (Tam et al., 2009; Wickramasinghe et al., 2009). Luo et al. (2017) revealed that nitrogen inputs in mangrove sediments decreased the bacterial density and increased the fungal density. However more recently, amendments of ammonium and nitrite into mangrove sediments altered the structure of AOB, AOA, and anammox bacteria (Li and Gu, 2013).

Resilience of microorganisms should be facilitated by their high abundances, high growth rates, high dispersal rate and high diversity (Fenchel and Finlay, 2004). Although the short-term response of microbial communities in mangrove sediments subjected to anthropogenic inputs is relatively well described, their actual resilience capacities are less documented. The aim of this study is to assess both resistance and resilience capacities of microbial communities of mangrove sediments exposed to anthropogenic disturbances. In relation with the heterogeneity of mangroves ecosystems which are organized along environmental gradients (salinity, nutrient availability, temperature), according to the sediment characteristics and the length of immersion by tides (Ball, 1998; Robertson et al., 1992), the structure of microbial communities is quite variable (Tam, 1998; Li and Gu, 2013; Wang et al., 2014). It can be assumed that the stability (resistance and resilience) properties of these communities varies as well. Our hypothesis is that in the mangrove zones that undergo the widest variations of the environmental conditions the microbial communities should be more stable than in the mangrove zones where the conditions are more constant. Indeed, natural fluctuations of the environment should select more resistant or tolerant taxa (Alongi, 2008).

To test this hypothesis, this study focused on two contrasted mangrove zones, respectively dominated by *Rhizophora mucronata* trees and *Ceriops tagal* trees. In the *Rhizophora*-dominated zone, closer to the seafront, the conditions are more constant, buffered by the tides but the longer immersion duration leads to longer anoxia of the sediment. In the *Ceriops*-dominated zone, the influence of tides is less important, the anoxia periods are shorter but the organisms are more submitted to aridity and salinity (Spalding et al., 2010; Tomlinson, 2016). The disturbance applied in these two mangrove zones was daily discharges of pretreated

domestic wastewaters (PW). The *in situ* experimental system used was set up in a mangrove of Mayotte Island in 2008 by Herteman et al. (2011). It helped to evaluate the impact of PW on microbial communities after one year (Bouchez et al., 2013) and 4.5 to 5 years (Capdeville et al., submitted for publication) of discharges. In the present study, this experimental system was modified to assess both short- (after 3 weeks, 3, 8, and 12 months) and long-term (after 7.5 to 8.5 years) responses of microbial communities exposed to PW discharges, and their resilience after 19 months of the disruption of PW discharges.

## 2. Material and methods

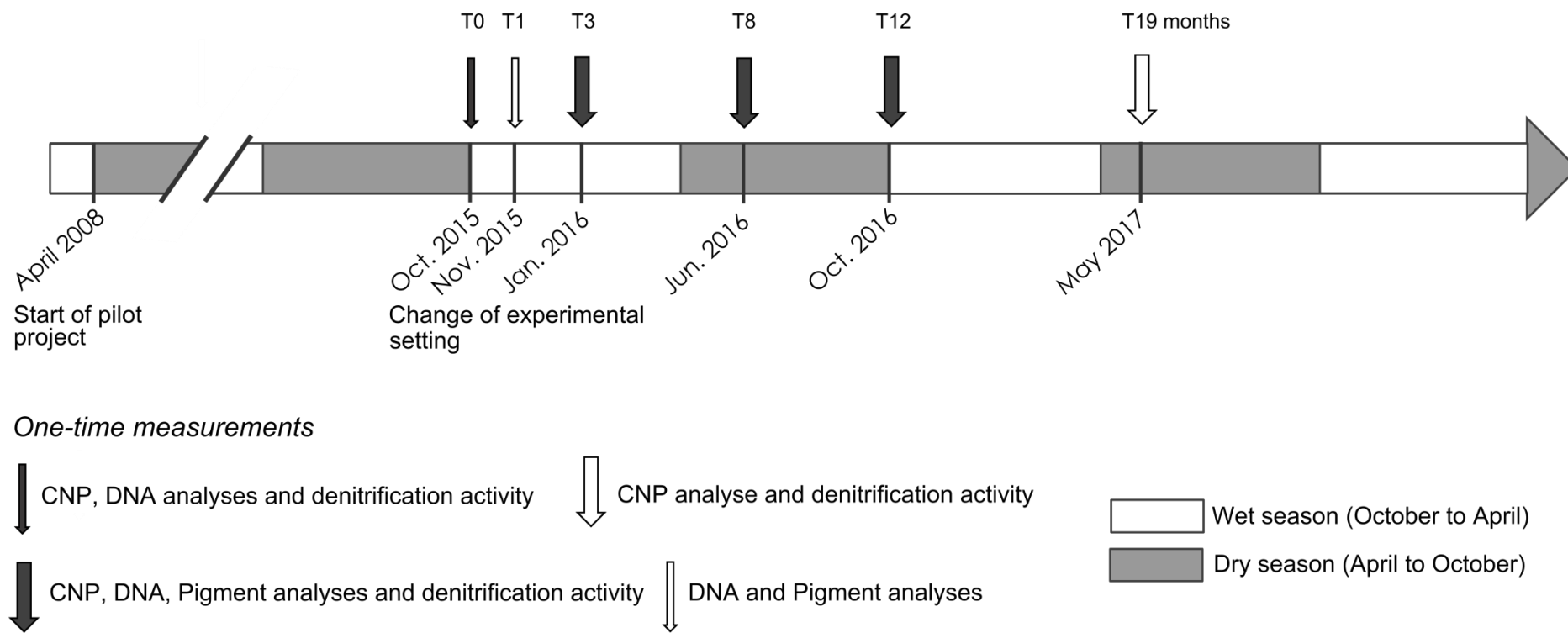
### 2.1. Study site

The *in situ* experimental system is situated in the mangrove of Chirongui Bay, South-West of Mayotte Island, a French department located in the Mozambique Channel, South-West of Indian Ocean (12°55'S, 45°09'E). Since April 2008, the study site continuously collects domestic wastewaters from Malamani village (250 inhabitants-equivalent), as described by Herteman *et al.* (2011). The wastewaters are pretreated in a horizontal primary settlement tank with integrated sludge digester. Then, they are carried through a pipe network to the mangrove areas. The areas of the *R. mucronata* mangrove zone are closer from the lagoon (about 400 m) than the ones in *C. tagal* mangrove zone (about 500 m), the latter being less subjected to tides (in mean 0.88 hr/day of immersion against 4.33 hr/day). The PW were mainly composed of organic matter, nitrogen and phosphorus nutrients, discharged in the mangrove areas with surface loading rates (for dry season, in g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>) of 6.1 for chemical oxygen demand, 2.0 for biological oxygen demand after 5 days, 2.13 for suspended solids, 0.99 for total nitrogen and 0.111 for total phosphorus (data obtained for 2015 to 2017 from SIEAM, Mayotte, France). From April 2008 to October 2015, PW have been discharged at a volume of 10 m<sup>3</sup> once per day, during a low tide, for one hour onto mangrove areas (around 675 m<sup>2</sup>, 15 m x 45 m) respectively dominated by the mangrove trees *Rhizophora mucronata* Lam and *Ceriops tagal* (Perr.) C.B. Robinson (see Figure 1 in the chapter 5 of the thesis), giving a hydraulic loading rate of 14.8 L.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>, which is equivalent to a rainfall event of 14.8 mm. Near these two “impacted” areas, two other areas not subjected to PW discharge were used as “control” areas (see Figure 1 in the chapter 5 of the thesis). In October 2015 (at time T0), the experimental setting was changed to assess the resilience and the resistance capacities of microbial communities for 19 months. In each mangrove zones, four different areas were delimited (around 225 m<sup>2</sup>, 15 m x 15 m): one part of the initial impacted area was still impacted in the

new discharge network (C-II and R-II areas in *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones, respectively) while in the another one the PW discharge were stopped at the T0 (C-IC and R-IC areas), one part of the initial control area was still a control after the T0 (C-CC or R-CC areas) while the another one receives PW discharge since the T0 (C-CI or R-CI areas) (see Figure 1 in the chapter 5 of the thesis). In each area, 4 plots (1 m<sup>2</sup>) were randomly chosen, marked out and used for all the samplings. The short-term impact of PW supply and the resilience capacities of microbial compartment were evaluated from October 2015 to May 2017, at T0, T0 + 3 weeks, T0 + 3 months, T0 + 8 months, T0 + 12 months and T0 + 19 months, during the dry season (May-October) and the wet season (November-April) (Figure 1).

## 2.2. Quantification of C, N, and P elements in sediments

In each area, one sediment core per plot (4 cores in total) was carried out with a syringe (50 mL) and divided into 2 subsamples, the surface layer (0-1 cm) and the 8-9 cm-layer. The sediment samples were dried and weighed after desiccation in an air oven at 105°C during 2 days. N and C quantities were measured in a powder of dry sediments with a ThermoFisher Flash 2000 elemental analyzer (Thermo Fisher Scientific, USA). Total phosphorus (P) was measured in acid condition after a persulfate oxidation using the ammonium molybdate spectrophotometry method.



**Figure 1.** Organization of sampling during the study period from October 2015 to May 2017.

## 2.3. Estimation of total bacterial density and N-cycle microorganism densities

### 2.3.1. Sediment sampling

Sampling of sediments was performed at the T0 of the experiment, and after 3 weeks, 3, 8 and 12 months. In each area, one sediment core (10 cm-depth) per plot (4 cores in total) was carried out with a syringe (50 mL), placed into 350 mL of RNAlater solution, homogenized and maintained at 4°C until treatment of samples at the laboratory. RNAlater solution was used in order to protect RNA contents for other experiments. This solution was prepared only with RNase-free glassware and water treated with dimethyl dicarbonate (DMDC). First, the DMDC-water were prepared with 1 mL of DMDC (Merck, Germany), 50 mL of ethanol absolute and ultrapure water QSP 1 L. This DMDC-water was incubated overnight at 37°C before autoclaving (at 121°C, 1 bar, and 20 min) and was used for all solutions. Then 1.5 L of RNAlater solution were made with 935 mL of DMDC-water, 700 g of ammonium sulfate (Sigma Aldrich, France), 25 mL of 1 M sodium citrate solution (Sigma Aldrich, France) and 40 mL of 0.5 M EDTA (Sigma Aldrich, France). The pH of RNAlater solution was adjusted at 5.2.

### 2.3.2. DNA extraction

Before DNA extraction, some subsamples of the sediments were washed three times with PBS 1 X (AccuGENE, Lonza, Switzerland) to remove the RNAlater solution. DNA extraction was performed on 2.5 g of wet sediments after an RNA extraction with the RNA Powersoil® DNA Elution Accessory kit (MoBio, Quiagen, USA) according to manufacturer's instructions. The quality of total DNA was checked using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermofisher Scientific, USA) and by gel electrophoresis (agarose, 1 % in TAE 0.5X).

### 2.3.3. Quantitative PCR on 16S *r*DNA, *nosZ* clade I and *amoA* genes

The total density of bacteria in sediments was determined with the abundance of the bacterial 16S *r*DNA gene. Standard curves were obtained using serial dilution of DNA extracted from an *Escherichia coli* culture. The densities of bacteria involved in functional processes were determined with the *nosZ* clade I gene for denitrification and the *amoA* gene for nitrification. The latter was targeted also to determine the density of nitrifying archaea. Standards were amplified from environmental samples in a total volume of 25 µL, containing 25 (*nosZ* clade I) or 10 (*amoA*) ng of DNA template, 1 U of GoTaq® G2 Flexi DNA polymerase (Promega),

1X GoTaq® G2 Flexi buffer, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.8 mM dNTP, 1 µM (*nosZ* clade I) or 0.2 µM (*amoA*) of each primer and 0.3 (*nosZ* clade I) or 0.2 (*amoA*) mg.mL<sup>-1</sup> of BSA. Thermal cycling conditions and primers used for each reaction are described in Table 1. Every PCR started with an initial step at 95°C for 10 min and finished by a final step at 72°C for 3 min. PCR fragments (259 bp for *nosZ* clade I, 491 bp for bacterial *amoA*, 635 bp for archaeal *amoA*) were next cloned into a pGEMT plasmid using the pGEM®-T Easy Vector System II (Promega) according to the manufacturer's recommendations. Plasmids extractions were carried out with the NucleoSpin® Plasmid kit (Macherey-Nagel, France) following the manufacturer's instructions. Recombined plasmids were linearized with the *EcoRI* restriction enzyme (Promega). Standard curves were obtained using serial dilution of linearized plasmids containing 10<sup>1</sup> to 10<sup>7</sup> gene copies.µL<sup>-1</sup>.

Quantitative PCRs (qPCR) were performed in triplicate for each DNA extract. The quantification was based on the fluorescence intensity of the SYBR green dye, which binds to double-stranded DNA. The qPCR analyses of sediment samples were carried out in a final volume of 20 µL containing 1X of Takyon™ Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue (Eurogentec, Belgium), 0.3 mg.mL<sup>-1</sup> of BSA (Promega), 5 µL (16S rDNA and *amoA* genes) or 4 µL (*nosZ* clade I) of 1/100-DNA samples or standards and 0.3 µM, 0.5 µM, and 0.2 µM of each primers (Eurofin, Germany) for 16S rDNA, *nosZ* clade I, and *amoA* genes respectively (Table 1). QPCRs were carried out on the StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) starting by an initial enzyme activation at 95°C for 3 min for each qPCR. The thermal cycling conditions used for qPCR of each gene are described in Table 1. Serial dilutions of the DNA extracted from sediment samples were quantified and compared to check the presence of PCR inhibitors but no inhibition was detected. Melting curves were analyzed using StepOne™ v2.3 software to confirm the specificity and efficiency of the amplification and the quantifications of gene in samples were deduced from standard curve. Results were expressed in number of gene copies per gram of sediment dry weight.

**Table 1.** PCR primers (Eurofin, Germany), and thermal conditions, (AOB: ammonium oxidizing bacteria, AOA: ammonium oxidizing archaea).

Target	Gene	Method	Primers	Sequence (5' – 3')	Thermal conditions			Nb of cycles	Type	References
Bacteria	16S	qPCR	Primer P1	CCTACGGGAGGCAGCAG	95°C, 15 s	61.5°C, 45 s	-	40	classic	Muyzer <i>et al.</i> (1993)
			Primer P2	ATTACCGCGGCTGCTGG						
Denitrifying	<i>nosZ</i>	PCR	nosZ1F	WCSYTGTTCMTGACAGCCAG	95°C, 15 s	67°C-62°C,	72°C, 30 s	6 and 35	Touch	(Henry <i>et al.</i> , 2006)
bacteria	clade I		nosZ2R	ATGTCGATCARCTGVKCRTTYTC		30 s			down	
		qPCR	nosZ1F	WCSYTGTTCMTGACAGCCAG	95°C, 10 s	67°C-62°C,	-	6 and 40	Touch	Henry <i>et al.</i> (2006)
			nosZ2R	ATGTCGATCARCTGVKCRTTYTC		45 s			down	
AOB	Bacterial <i>amoA</i>	PCR	amoA1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	95°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 45 s	35	classic	Rotthauwe <i>et al.</i> (1997)
			amoA2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC						
		qPCR	amoA1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	95°C, 15 s	58°C, 2 min	-	40	classic	(Rotthauwe <i>et al.</i> , 1997)
			amoA2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC						
AOA	Archaeal <i>amoA</i>	PCR	amoA19F	ATGGTCTGGCTWAGACG	95°C, 30 s	53°C, 1 min	72°C, 1 min	35	classic	Tourna <i>et al.</i> (2008)
			Crenamo	GCCATCCABCKRTANGTCCA						Leininger, personal communica-
			A616r48x							tion (2006)
		qPCR	amoA19F	ATGGTCTGGCTWAGACG	95°C, 25 s	55°C, 2 min	-	40	classic	Tourna <i>et al.</i> (2008)
			Crenamo	GCCATCCABCKRTANGTCCA		45 s				Leininger, personal communica-
			A616r48x							tion (2006)

#### 2.4. Estimations of potential denitrification activity (DEA)

DEA was performed on sediment samples collected during the 5 sampling campaigns. In each area, one sediment core (10 cm-depth) on each of the 4 plots was carried out with a syringe (50 mL), homogenized into 100 mL-tube, kept in a cooler box during transport and stored at 4°C until treatment of sediment samples few days later at the laboratory to limit the modification of denitrification activity.

For each sample, 2 flasks (150 mL) were prepared and filled with 10 mL of sediments collected with a syringe (10 mL). All flasks containing sediments were pre-incubated at 30°C during 24 hours to re-activate bacteria. After 24 h, 50 mL of incubation medium were added to each flask. This medium was composed by deoxygenated demineralized water containing N-NO<sub>3</sub> (100 mg.L<sup>-1</sup>) and organic C (50 mg.L<sup>-1</sup>), at a salinity of 30 psu. Then the flasks were sealed with rubber stoppers and deoxygenized by diffusion of N<sub>2</sub> during 20 min. Then, 15 mL of incubation medium saturated with acetylene were added in one flask per sample, the other one receiving medium without acetylene (negative control). All the flasks were incubated in the dark at 30°C with agitation. After 3 and 6 h of incubation, the flasks were vigorously stirred for 20 seconds and 6 mL of gas were sampled and injected in vacuum 8 mL-vials. Then, the 6 mL of sampled gas were replaced by 6 mL of N<sub>2</sub>. The acetylene blocks the last step of denitrification (formation of N<sub>2</sub> from N<sub>2</sub>O), allowing the accumulation of N<sub>2</sub>O in the flasks (Sørensen, 1978). Finally, N<sub>2</sub>O concentrations of all gas samples were analyzed on a gas chromatograph (VARIAN 3800) equipped with a <sup>63</sup>Ni capture detector. The carrier gas was a mixture of argon/methane (90/10 v/v). The separation was made on a Porapak Q column at 80°C, the injector and detector temperatures were 120°C and 280°C, respectively.

After the incubations, the ash-free dry mass (AFDM) of each sediment sample was determined after combustion (at 550°C, for 8 h). The N<sub>2</sub>O quantified in the flasks without acetylene was produced by the activity of denitrifying bacteria lacking the gene *nosZ*, like those having the genes *nirS* or *nirK*, while the N<sub>2</sub>O in the flasks with acetylene was produced by all the denitrifying bacteria (Philippot et al., 2011). The ratio of N<sub>2</sub>O quantities in flasks without / with acetylene is an indication of the importance of *nirS* / *nirK* bacteria compared to *nosZ* bacteria.



## 2.5. Study of the global structure of microbial photosynthetic communities

### 2.5.1. Extraction of photosynthetic pigments in sediments

At T0 + 3 weeks, and T0 + 3, 8 and 12 months, two sediment samples (1 cm-depth) were collected in each plot (4 plots per areas) in all areas with a syringe (50 mL), kept in a cooler box during transport, and stored at -20°C until storage at -80°C at the laboratory. Before extraction, sediment samples were freeze-dried for 24 hours and homogenized. The pigments from approximately 0.5 g of dry sediments were extracted with 5 mL of methanol buffered with 2 % of 1 M-ammonium acetate (Sigma-Aldrich, France). After 2 min in an ultrasound cold bath and at maximum power, samples were kept in the dark at -20°C for 15 min before centrifugation (High Conic Rotor, Thermo Scientific, 3220 g, 2°C, and 5 min). Supernatants were collected and the pellets were re-extracted as described above. The pooled supernatants were filtered on 0.2 µm PTFE membrane syringe filter (Ø 13 mm, VWR International, USA) and stored a few days at -80°C before High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis. To prevent degradation of pigments, extractions were performed under dark conditions and samples stored on ice during handling.

### 2.5.2. HPLC analyses

HPLC analyses were performed with a 100 µL-loop auto-sampler and a quaternary solvent delivery system coupled to a diode array spectrophotometer (LC1200 series, Agilent technologies, USA). The mobile phase was prepared (solvent A: 70:30 (v/v) methanol:1M ammonium acetate and solvent B: 100 % methanol) and programmed (minutes; % solvent A; % solvent B): (0; 75; 25), (1; 50; 50), (20; 30; 70), (25; 0; 100), (32; 0; 100) according to the analytical gradient protocol described by Barlow *et al.* (1997). The column was then reconditioned to original conditions over a further 12 min. Pigment separation was performed through a C8, 3 µm-column (MOS-2 HYPERSIL, Thermo Scientific, USA). The diode array detector was set at 440 nm to detect carotenoids, at 665 nm for chlorophylls and pheopigments. Pigments were identified by comparing their retention time and absorption spectra with those of pure standard pigments (DHI LAB products, Denmark). Each pigment concentration was calculated by relating the peak area of its chromatogram with the corresponding area of calibrated standard using ChemStation software (version A.10.02, Agilent technologies). For each sample, we worked on the ratios between total pigment concentrations and chlorophyll *a*

concentration. From this matrix, we calculated similarities with the Bray Curtis index between all areas of *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones at each sampling time.

## 2.6. Statistical analysis

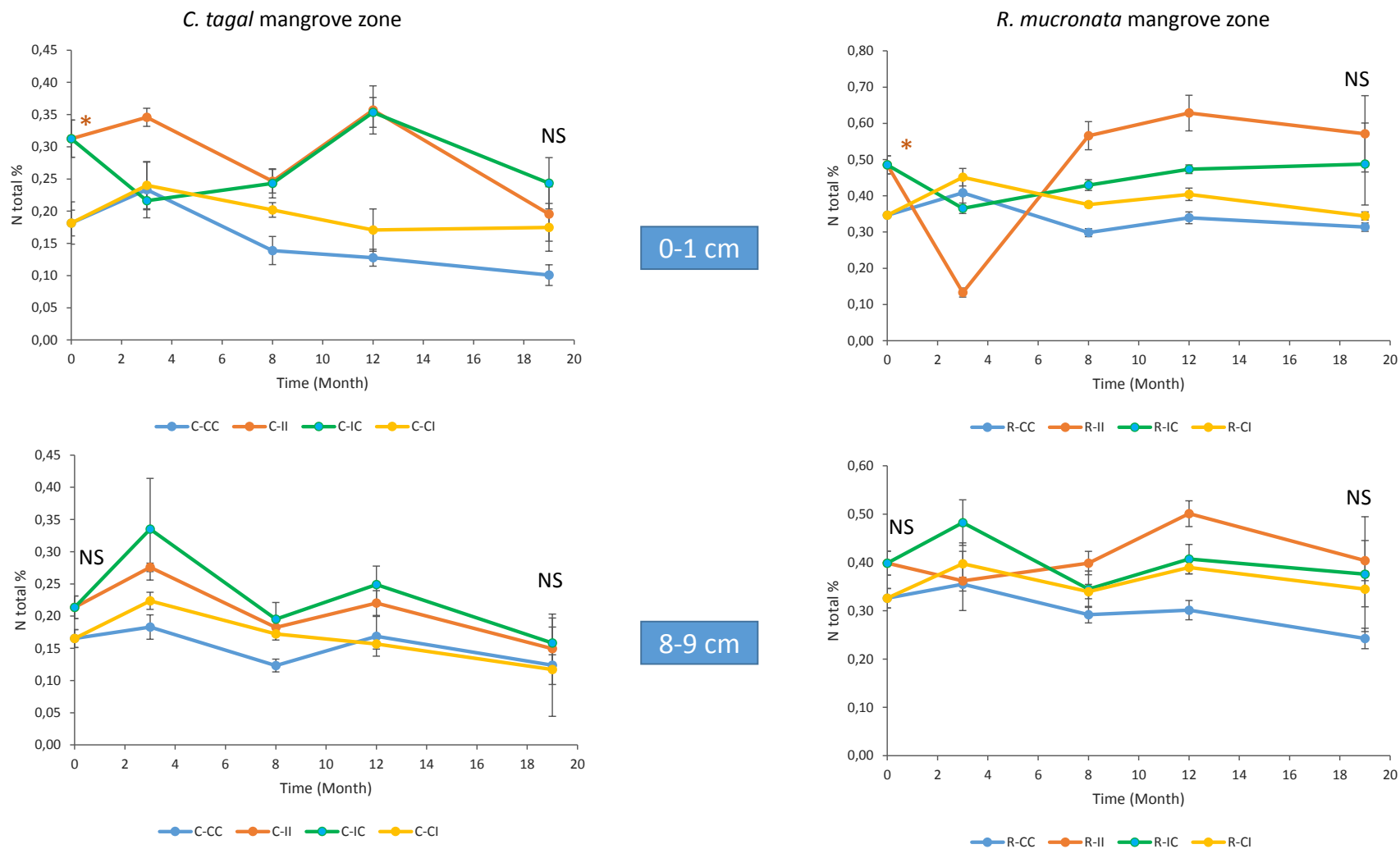
Statistical analysis were performed using the PAST software (PAleontological STatistics, versions 2.17 and 3.06) (Hammer *et al.*, 2001). The normality was checked on each dataset with the Shapiro-Wilk test and data were transformed if needed. When data were normally distributed, two-way ANOVAs were used to test the effects of mangrove zone (*R. mucronata* vs *C. tagal*) and treatment (control vs impacted areas), followed by a Tukey post-hoc test. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used with Mann-Whitney test for pairwise comparisons of non-parametric data. Statistical differences between sampling campaigns (T0, T0 + 3 weeks and T0 + 3, 8, 12 and 19 months) were analyzed with one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test or by the non-parametric Kruskal-Wallis test with Mann-Whitney test for pairwise comparisons according to the type of distribution. Data given in the text are means  $\pm$  SE. For all statistical analyses, significance was inferred at  $p < 0.05$  (noted \* if  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ ).

## 3. Results

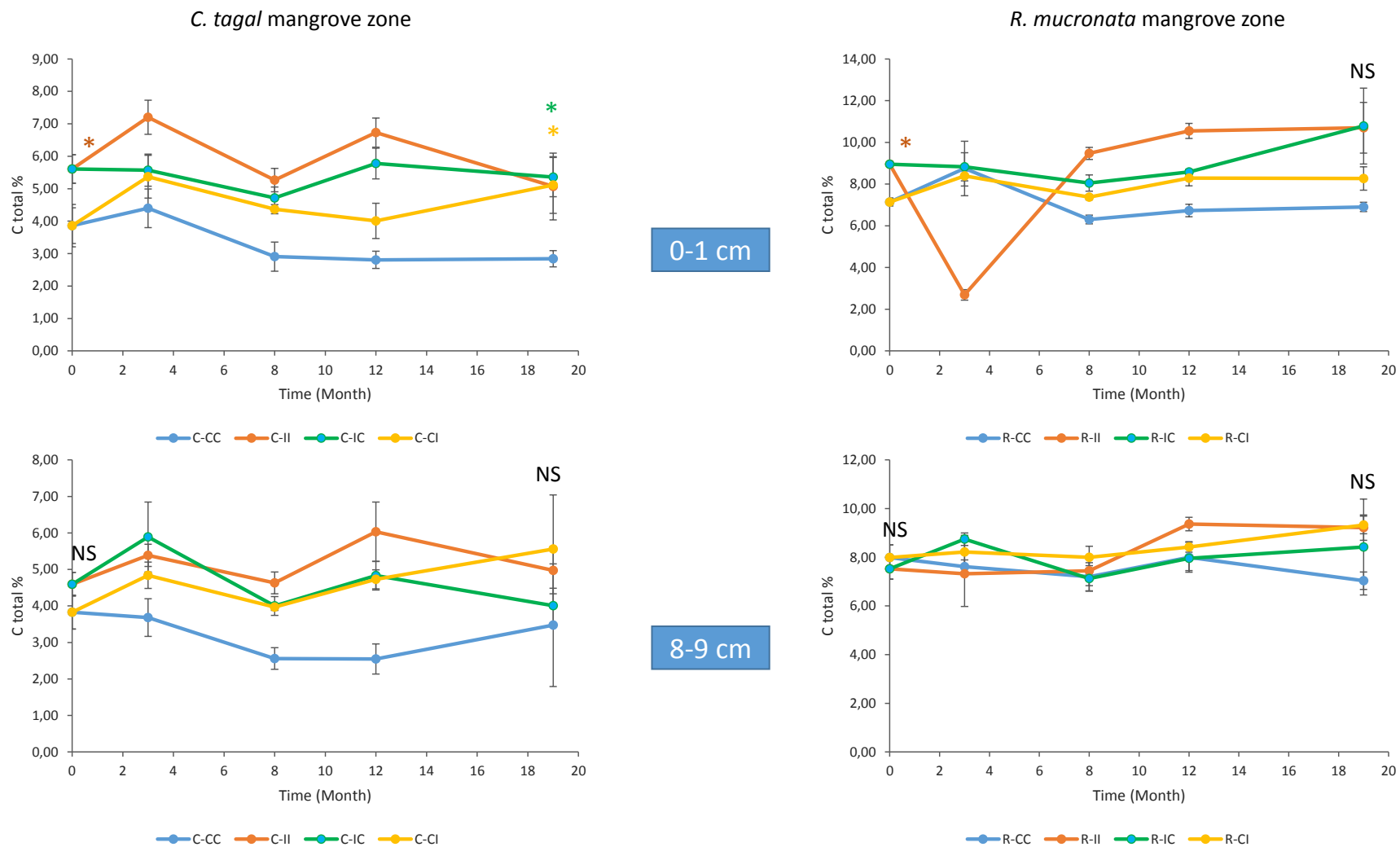
### 3.1. Sediment elementary composition

The dynamics of sediment elementary composition was assessed at two depths (0-1 cm and 8-9 cm) in each area of *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones (Figure 2). At T0, the proportion of nitrogen (N) in the surface layer was significantly higher in C-II and R-II ( $0.31 \pm 0.03$  % for *C. tagal* and  $0.49 \pm 0.02$  % for *R. mucronata*) than in C-CC and R-CC control areas ( $0.18 \pm 0.02$  % for *C. tagal* and  $0.35 \pm 0.01$  % for *R. mucronata*) in both mangrove zones (Figure 2). It was still the case at T0 + 19 months. In contrast, no significant difference in this proportion was observed overtime in the 8-9 cm-layer between the control and impacted areas (Figure 2). The monitoring of N content overtime did not show any resilience in C-IC and R-IC areas (Figure 2). No significant difference in N proportion was observed after 19 months between all areas in both mangrove zones. The equilibrium state of N content was reached in all areas, because the proportions were stable overtime, even in the presence of rejects. This state is nevertheless reached more rapidly in the 8-9 cm-layer compared to the surface layer, and in *R. mucronata* mangrove zone compared to *C. tagal* mangrove zone (Figure 2).

At T0, the proportion of C in surface layer was significantly higher in C-II and R-II ( $5.61 \pm 0.44$  % for *C. tagal* and  $8.95 \pm 0.14$  % for *R. mucronata*) than in C-CC and R-CC areas ( $3.86 \pm 0.55$  % for *C. tagal* and  $7.14 \pm 0.19$  % for *R. mucronata*) in both mangrove zones (Figure 3). At T0 + 19 months, the C-proportion was still higher in impacted areas compared to the control areas for the two mangrove zones. No significant resilience was observed after 19 months without discharges in C-IC and R-IC areas (Figure 3). No significant difference in C-proportion was observed in the 8-9 cm-layer between the control and impacted areas whatever the mangrove zones (Figure 3). Concerning the response of C proportion after 19 months of PW discharges, it was only in the surface layer of C-CI area than a significant increase could be observed (Figure 3).



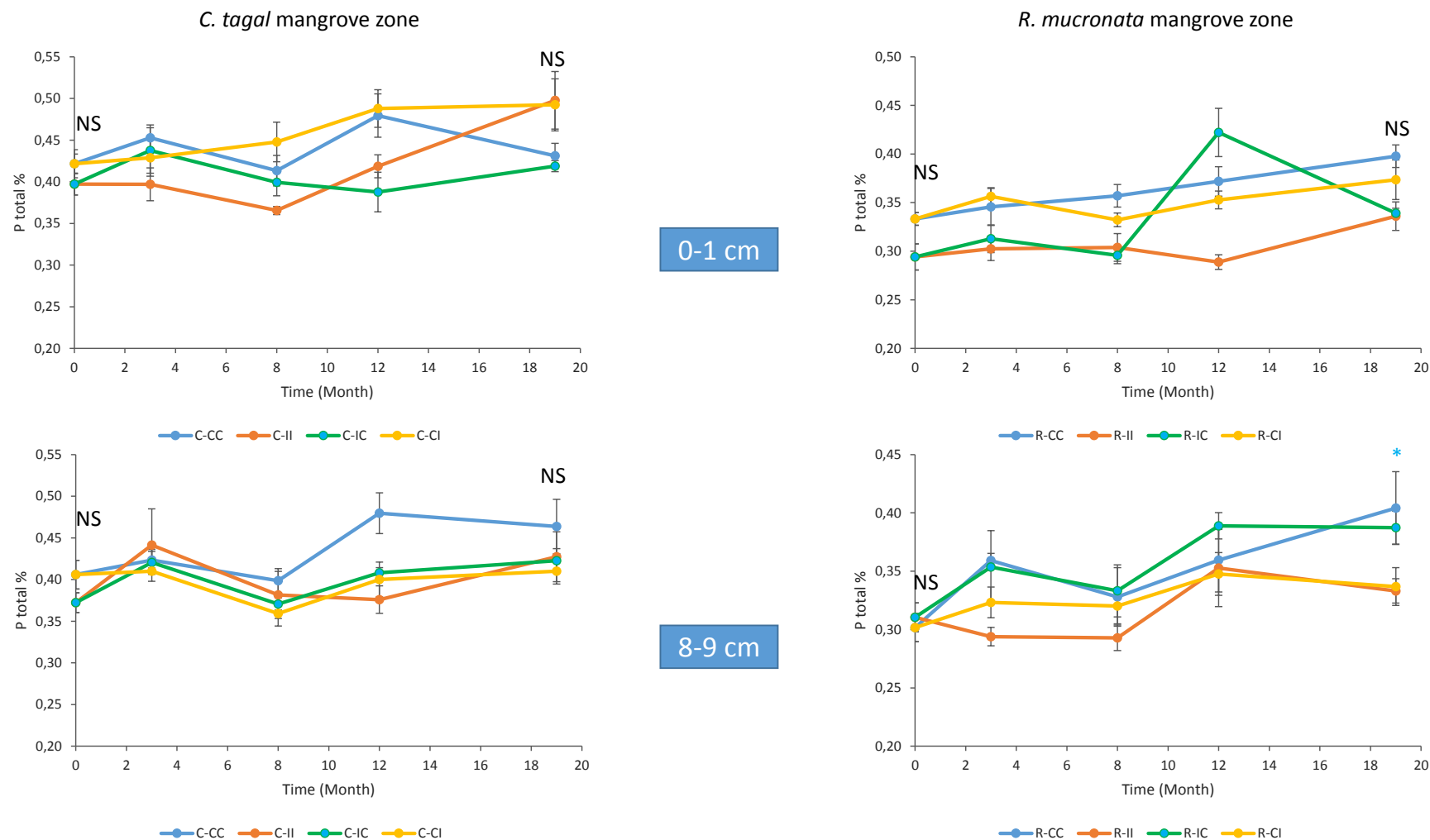
**Figure 2.** Dynamic of N content (%) in 0-1 and 8-9 sediment layers of *C. tagal* and *R. mucronata*. Significant differences (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis) are indicated with \*  $p \leq 0.05$  for differences between control and impacted areas.



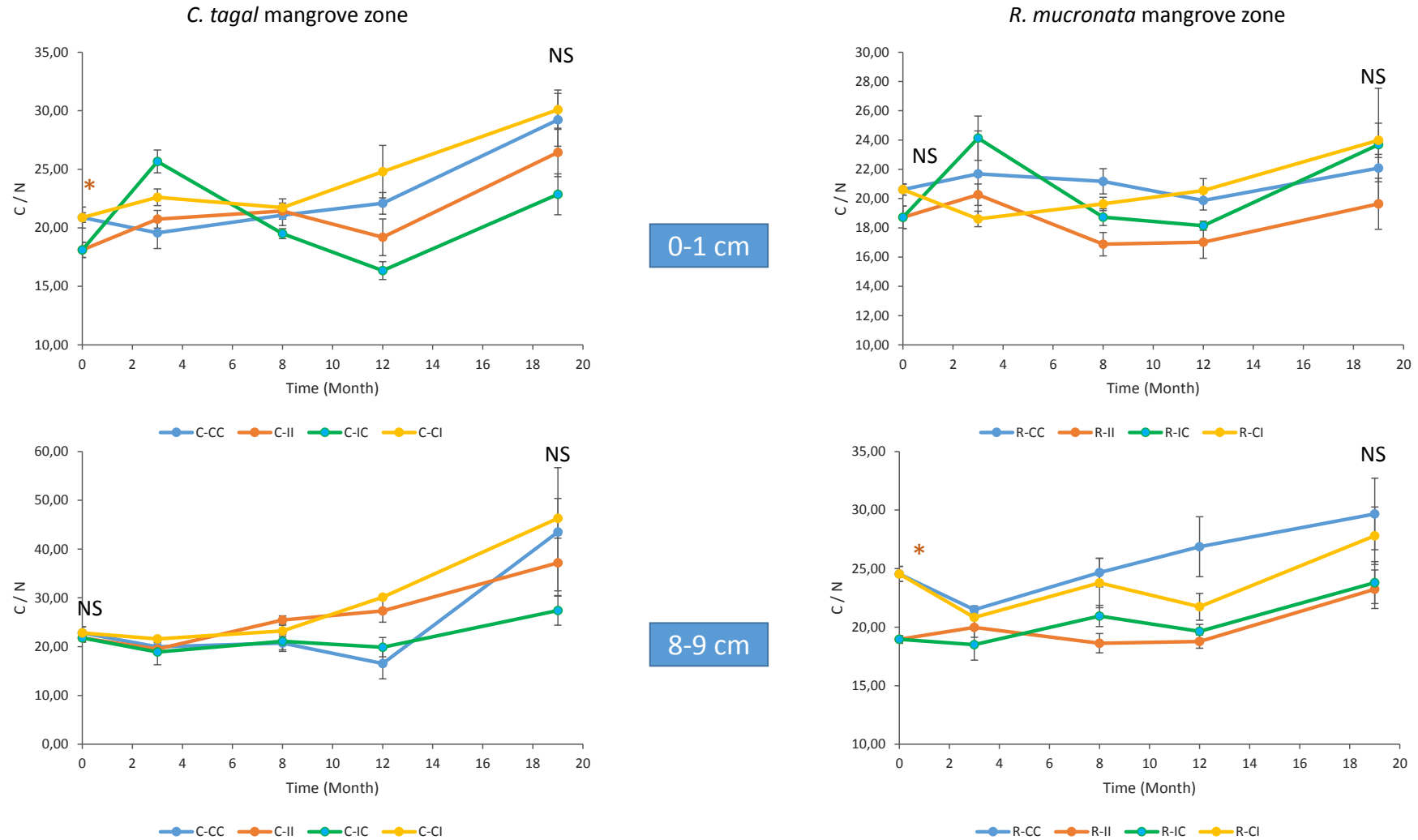
**Figure 3.** Dynamic of C content (%) in 0-1 and 8-9 sediment layers of *C. tagal* and *R. mucronata*. Significant differences (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis) are indicated with \*  $p \leq 0.05$  for differences between control and impacted areas.

The proportion of phosphorus (P) at T0 was similar in control and long-term impacted areas for both layers: around 0.4 % and 0.3 % of P in *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones, respectively (Figure 4). Nevertheless, the proportion of P tended to increase in the surface layers of C-II and C-CI areas after 19 months of PW exposure (Figure 4). No impact of PW discharge was observed in both layers of *R. mucronata* mangrove zone although P-proportion became similar in R-CI and R-II areas in the 8-9 cm-layer. In contrast with C- and N-proportions, the P-proportion was lower after 19 months of PW discharge in R-CI and R-II areas than in R-CC area (Figure 4). No significant resilience was observed in the surface layer of C-IC area but after 19 months the proportion of P was similar to the proportion in C-CC control area and lower than the C-II impacted area (Figure 4). Contrary to the results showed in the surface layer of *C. tagal* mangrove zone, in the 8-9 cm-layer of *R. mucronata* mangrove zone, a significant increase of the P proportion was observed in R-CC control and R-IC areas indicating a resilience of the P-proportion in R-IC area after 19 months without PW discharge (Figure 4).

At the T0, the C:N ratio was significantly lower in the surface layer of impacted areas ( $18.12 \pm 0.65$ ) than in the control area ( $20.88 \pm 0.89$ ) in *C. tagal* mangrove zone (Figure 5). Similar trends were observed in *R. mucronata* mangrove zone. Concerning the 8-9 cm-layer, the C:N ratio in impacted area of *R. mucronata* mangrove zone ( $18.95 \pm 0.34$ ) was significantly lower than in R-CC control area ( $24.54 \pm 0.65$ ) (Figure 5). At T0 + 19 months, no significant influence of PW absence or presence was observed in both layers of areas from both mangrove zones (Figure 5).



**Figure 4.** Dynamic of P content (%) in 0-1 and 8-9 sediment layers of *C. tagal* and *R. mucronata*. Significant differences (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis) are indicated with \*  $p \leq 0.05$  for differences between control and impacted areas.



**Figure 5.** Dynamic of C:N ratio in 0-1 and 8-9 sediment layers of *C. tagal* and *R. mucronata*. Significant differences (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis) are indicated with \*  $p \leq 0.05$  for differences between control and impacted areas.



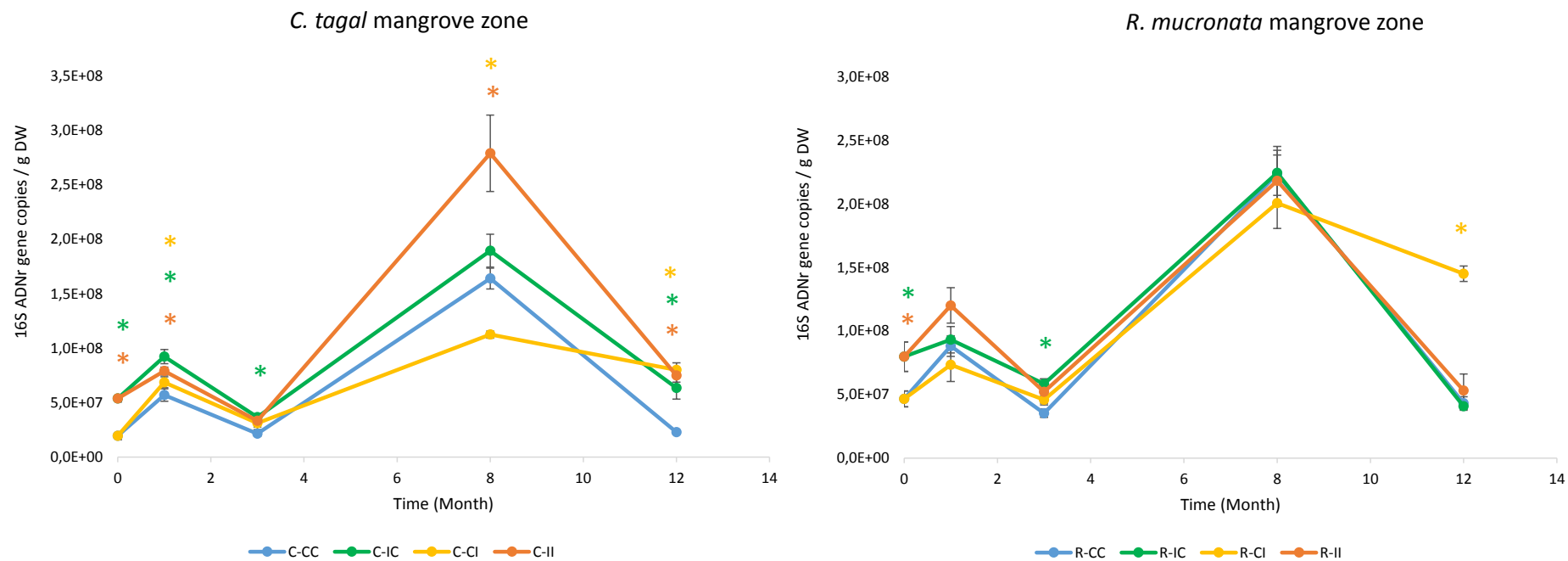
### 3.2. Microbial communities

#### 3.2.1. Total density of bacteria

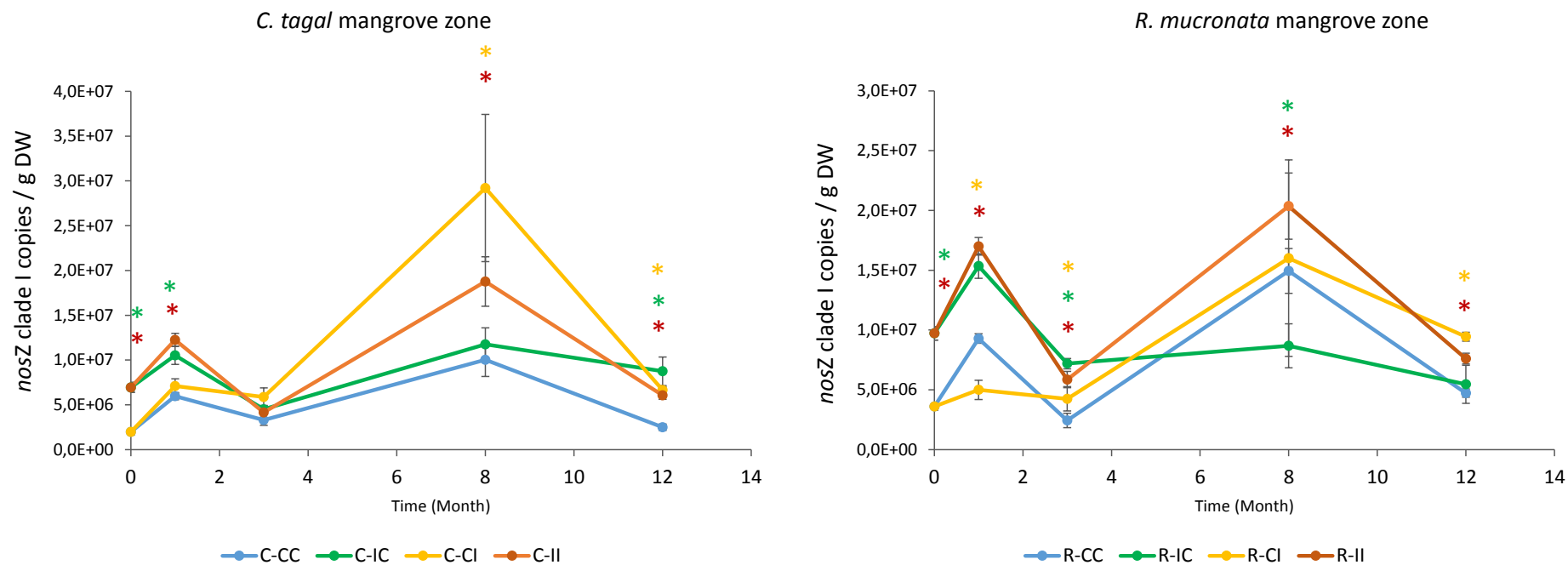
The total density of bacteria was followed through the number of copies of 16S *rDNA* gene in all areas of *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones during 12 months (Figure 6). First, the total density of bacteria was very variable overtime and depended on the season, indeed, the number of 16S *rDNA* gene copies strongly increased at 8 months whatever the areas and the mangrove zones, compared to the other time points (Figure 6). In *C. tagal* mangrove zone, at all the sampling times, the number of 16S *rDNA* gene copies was significantly higher in C-II impacted area ( $5.39 \times 10^7 \pm 3.23 \times 10^6$  16S *rDNA* copies/g DW) compared to the C-CC control area ( $1.95 \times 10^7 \pm 3.46 \times 10^6$  16S *rDNA* copies/g DW) (Figure 6). No resilience was observed after 12 months in C-IC areas without PW discharge. In the C-CI area, impacted by the PW since October 2015, a significant increase of the number of 16S *rDNA* gene copies was observed after 12 months compared to the C-CC area (Figure 6). Although no resilience and no long-term impact of PW discharges were observed in the *R. mucronata* mangrove zone, a significant short-term impact was revealed in R-CI area after 12 months (Figure 6).

#### 3.2.2. Density of functional groups

The abundances of denitrifying bacteria and nitrifying bacteria and archaea were followed overtime by the number of copies of *nosZ* clade I gene and the *amoA* gene, respectively. For the three genes, the number of gene copies was strongly variable overtime with maximum values for all areas at 8 months, like for the 16S gene. On the whole, the functional community was dominated by the denitrifying bacteria, from 2.7 to 6.6 times (for C-CC and C-CI areas, respectively) more abundant than the nitrifying archaea, which are 3.5-4.7 times (for C-IC and C-CC areas) more abundant than the nitrifying bacteria. For the *R. mucronata* mangrove zone, the denitrifying bacteria were 2.0-4.7 times (for R-CC and R-II areas) more abundant than the nitrifying archaea, which are 4.6-7.0 times (for R-CI and R-CC areas) more abundant than the nitrifying bacteria. From October 2015 to October 2016, the density of denitrifying was significantly higher in the long-term impacted areas ( $9.63 \times 10^6 \pm 2.65 \times 10^6$  *nosZ* clade I copies/g DW in C-II area,  $1.21 \times 10^7 \pm 2.80 \times 10^6$  *nosZ* clade I copies/g DW in R-II area) than in the control areas ( $4.75 \times 10^6 \pm 1.49 \times 10^6$  *nosZ* clade I copies/g DW in C-CC area,  $7.00 \times 10^6 \pm 2.30 \times 10^6$  *nosZ* clade I copies/g DW in R-CC area) (Figure 7).



**Figure 6.** Dynamic of 16S ADNr gene copies / g DW in sediments of *C. tagal* and *R. mucronata*. Significant differences (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis) are indicated with \*  $p \leq 0.05$  for differences between control and impacted areas.

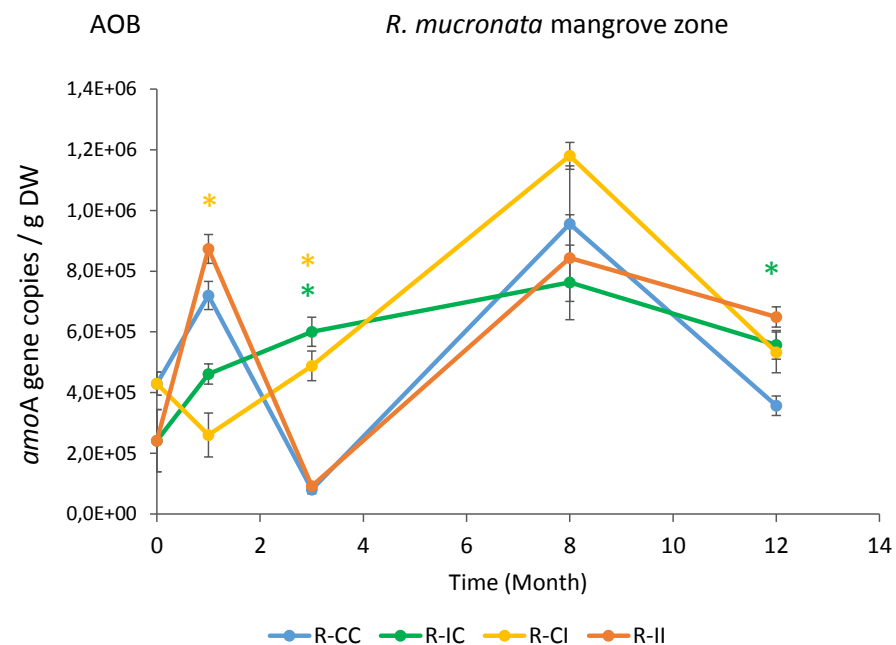
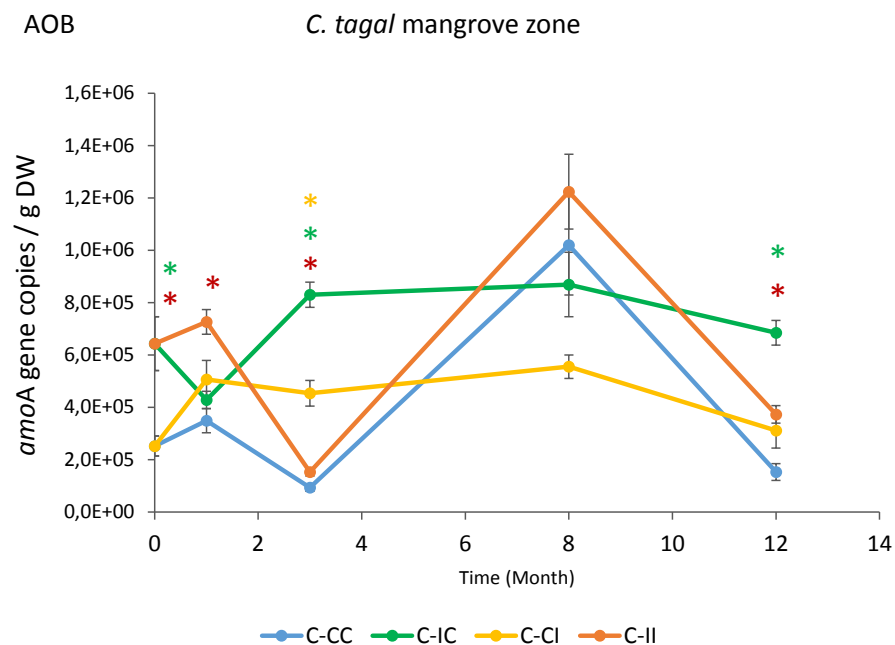


**Figure 7.** Dynamic of *nosZ* clade I gene copies / g DW in sediments of *C. tagal* and *R. mucronata*. Significant differences (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis) are indicated with \*  $p \leq 0.05$  for differences between control and impacted areas.

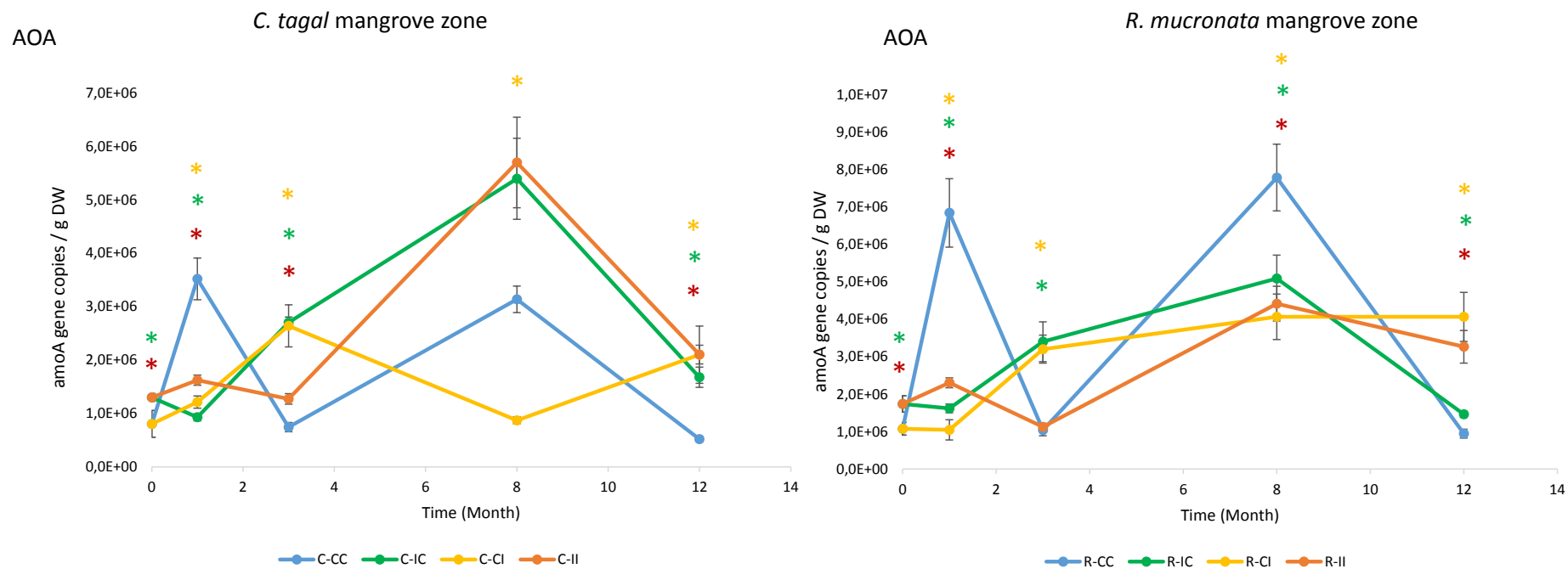
In R-IC area, the number of gene copies was significantly higher than in R-CC area at T0 and T0 + 3 weeks and T0 + 3 months then it decreased to reach similar values at T0 + 12 months. A similar trend was observed in C-IC area after 8 months but was not confirmed after 12 months (Figure 7). In C-CI area the number of gene copies increased faster than in the R-CI area, with significantly different values from control areas after 8 months and 12 months, respectively (Figure 7).

As shown in figure 8, the number of bacterial *amoA* gene copies was significantly higher in impacted area ( $6.23 \times 10^5 \pm 1.81 \times 10^5$  *amoA* copies/g DW) compared to the control area ( $3.73 \times 10^5 \pm 1.67 \times 10^5$  *amoA* copies/g DW) only in *C. tagal* mangrove zone. The C-CC and C-II areas of *C. tagal* mangrove zone seem to follow a temporal dynamics with maximum values at 8 months for both areas. On the contrary, for the C-CI and C-IC areas, which were modified at T0, the number of gene copies remained stable over time (Figure 8). In the *R. mucronata* mangrove zone, the number of *amoA* gene copies tended to increase after 3 months in R-CI area compared to the R-CC control area (Figure 8).

The number of archaeal *amoA* gene copies was significantly higher overtime in impacted area ( $2.40 \times 10^6 \pm 8.38 \times 10^5$  *amoA* copies/g DW) than in the control area ( $1.74 \times 10^6 \pm 6.51 \times 10^5$  *amoA* copies/g DW) for the *C. tagal* mangrove zone (Figure 9). In contrast, at 2 sampling dates (T0 + 3 weeks and T0 + 8 months), the number of *amoA* gene copies in *R. mucronata* mangrove zone was significantly lower in impacted area than in the control area (Figure 9). After 12 months, a decrease of the number of *amoA* gene copies was observed only in R-IC area. Besides, a significant increase of the number of *amoA* gene copies was observed in C-CI and R-CI areas after 12 months of PW discharges (Figure 9).



**Figure 8.** Dynamic of *amoA* gene copies / g DW for AOB in sediments of *C. tagal* and *R. mucronata*. Significant differences (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis) are indicated with \*  $p \leq 0.05$  for differences between control and impacted areas.



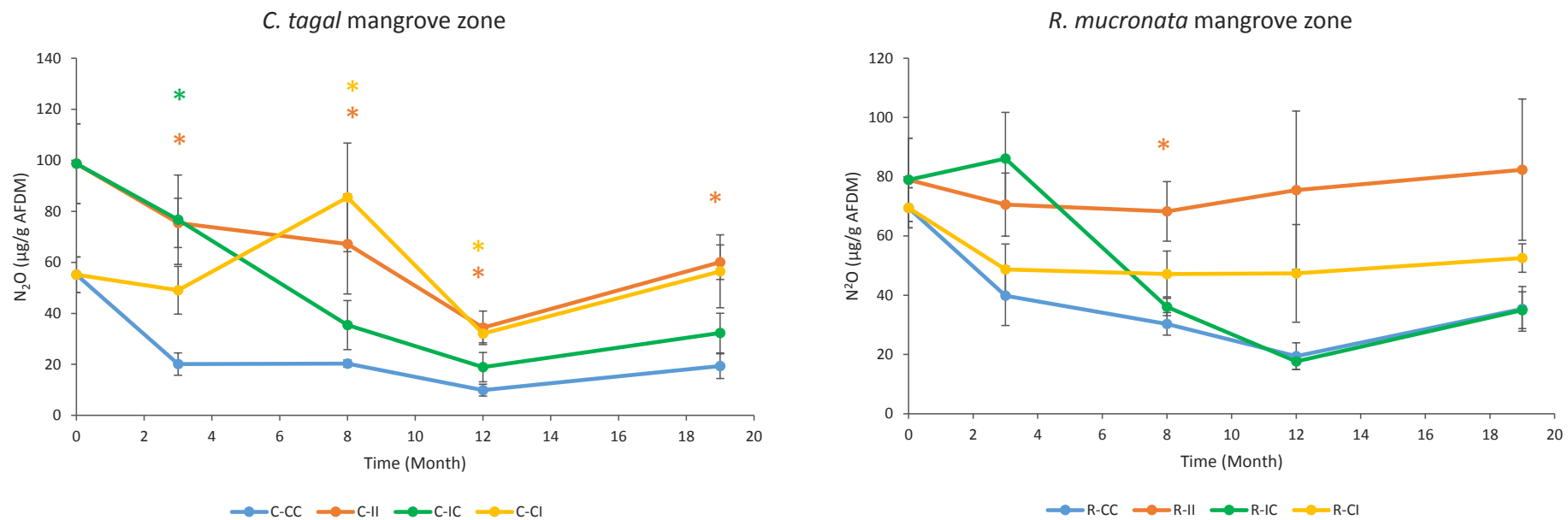
**Figure 9.** Dynamic of *amoA* gene copies / g DW for AOA in sediments of *C. tagal* and *R. mucronata*. Significant differences (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis) are indicated with \*  $p \leq 0.05$  for differences between control and impacted areas.

### 3.2.3. Potential denitrification activity

The potential denitrification activity (DEA) carried out by the denitrifying bacteria was assessed by measuring N<sub>2</sub>O production in sediments from all areas of *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones. In the *C. tagal* mangrove zone, the DEA was significantly higher in the impacted area than in the control area, at all the sampling dates (Figure 10). In the *R. mucronata* mangrove zone, the DEA followed the same trend although the differences were not significant. A decrease of N<sub>2</sub>O production was observed in C-IC and R-IC areas after 8 months without PW discharge. It was more marked in the *R. mucronata* mangrove zone (Figure 10). In contrast, an increase of N<sub>2</sub>O production was observed in C-CI, corresponding to the short-term impact of PW after 8 months of discharge (Figure 10). The DEA became similar in C-II and in C-CI areas. A similar trends were observed in *R. mucronata* mangrove zone but the N<sub>2</sub>O production in R-CI area did not reach the values in R-II impacted area (Figure 10).

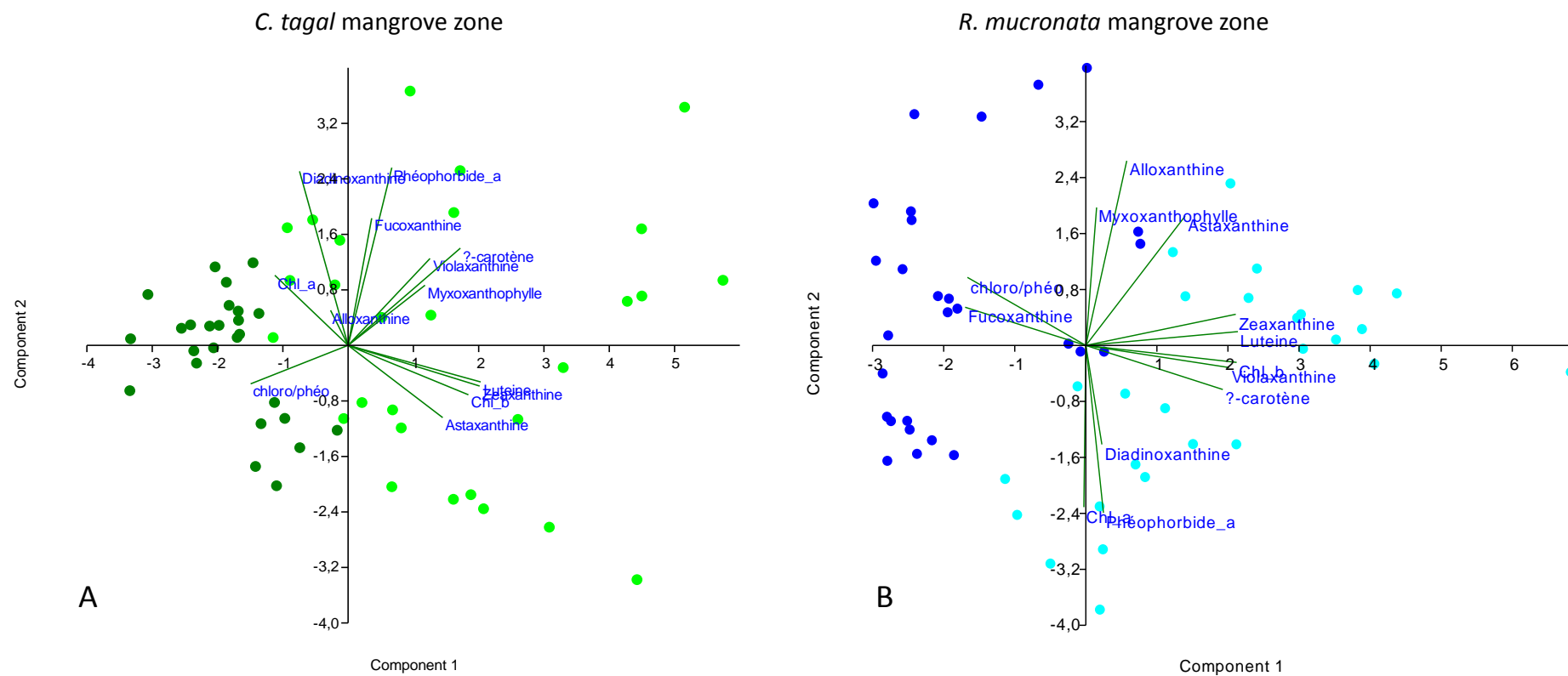
### 3.3. Structure of microbial photosynthetic communities

The global structure of microbial photosynthetic communities in all areas was assessed using pigments as biomarkers. As illustrated by PCA (Figure 11), PW discharges strongly modified the structure of phototrophic communities. In C-CC area, the communities were associated with higher chlorophyll *a* (chl*a*) concentrations and chlorophyll *a* / pheophytin *a* ratio, while in C-II area the communities were associated with higher proportions (ratio to chl*a* concentration) of chlorophyll *b*, lutein, zeaxanthin, β-carotene, myxoxanthophyll and violaxanthin (Figure 11). The latter pigments are indicators of the presence of green algae and cyanobacteria. In the *R. mucronata* mangrove zone, the impacted area was characterized by lower proportions of fucoxanthin (diatoms) and higher proportions of chlorophyll *b*, lutein, zeaxanthin, β-carotene and violaxanthin (Figure 11).



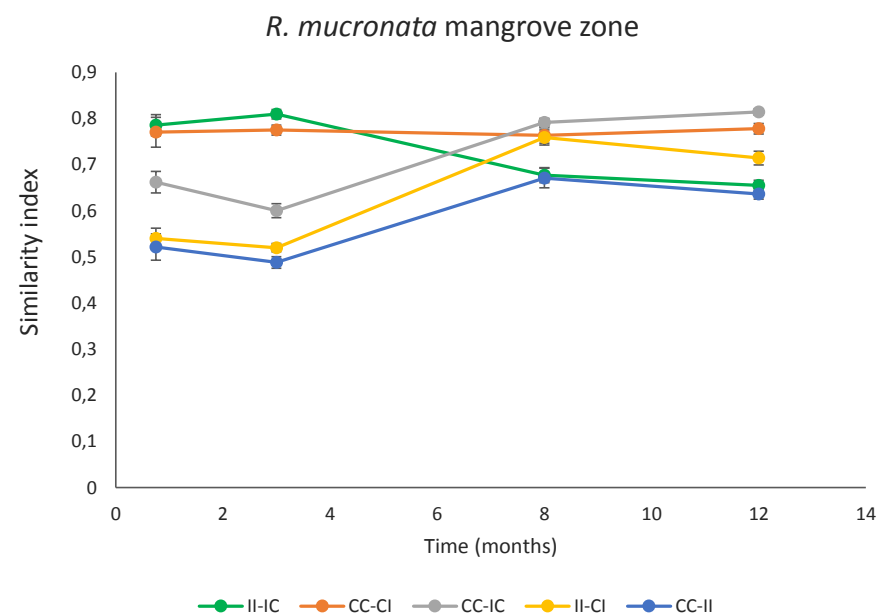
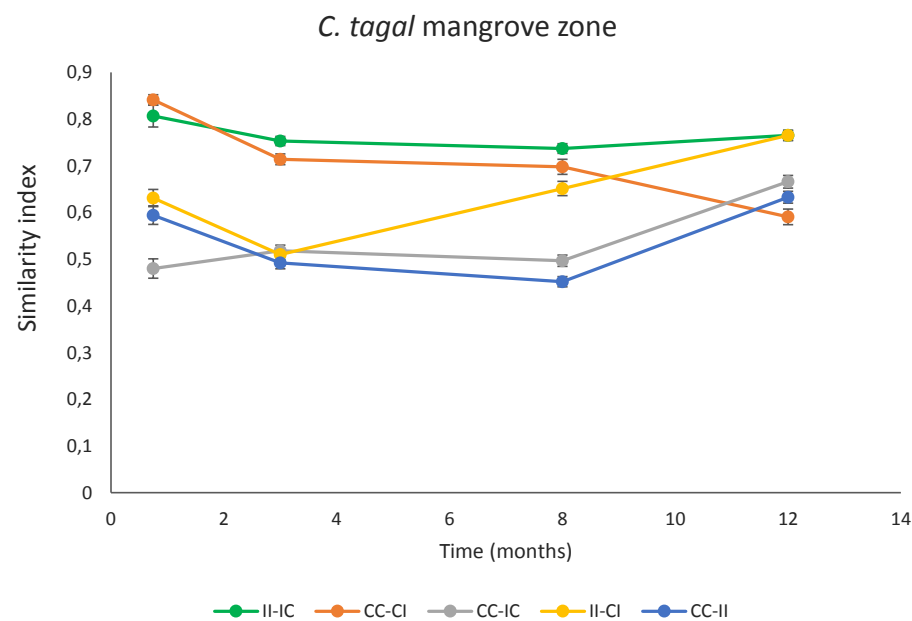
**Figure 10.** Dynamic of potential denitrification activity in sediments of *C. tagal* and *R. mucronata*. Significant differences (post-hoc test after ANOVA or Kruskal-Wallis) are indicated with \*  $p \leq 0.05$  for differences between control and impacted areas.





**Figure 11.** Principal component analysis on microbial photosynthetic communities from control (dark color) and impacted (light color) areas of *C. tagal* (A) and *R. mucronata* (B) mangrove zone, assessed using pigments as biomarkers.

The structures of the phototrophic communities were compared by using the Bray-Curtis similarity index. As expected after the results of PCA, the similarity between impacted and control areas were weak, with at T0  $0.59 \pm 0.02$  and  $0.52 \pm 0.03$  for *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones, respectively (Figure 12). The similarity between communities from C-IC and C-II areas remained stable over time, while the similarity between communities from C-IC and C-CC areas followed the same dynamics than similarity between communities from C-II and C-CC areas. This indicates the absence of resilience in C-IC area. In contrast, the similarity between communities from R-IC and R-CC areas significantly increased after 8 months without discharge, as an indication of resilience of R-IC communities (Figure 12). This was confirmed by a significant decrease of similarity between communities from R-IC and R-II areas after 8 months. A short-term impact was observed after 8 months in C-CI area as shown by the increase of the similarity between communities from C-CI and C-II areas, and the decrease of similarity between communities from C-CI and C-CC areas. At the opposite, the similarity between communities from R-CI and R-CC areas did not change overtime therefore no short-term impact was observed in *R. mucronata* mangrove zone (Figure 12).



**Figure 12.** Dynamic of Bray-Curtis similarity index used to compare the structure of microbial photosynthetic communities in sediments of *C. tagal* and *R. mucronata*.

## 4. Discussion

### 4.1. Sediment composition

PW discharges during more than 7 years induced an increase in C and N content in both mangrove zones. These proportions remained stable in the impacted areas during the 2 years of the study, indicating that sediment had reached an equilibrium state despite the continuous PW discharge. This suggests that additional C and N input in impacted areas were quickly removed from sediments either by microbial activities (Tam *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2008) or by vegetation assimilation (Ganguly *et al.*, 2009; Lambs *et al.*, 2011). In this study, the PW were mainly composed by ammonium which is the more plant-available form of nitrogen and the most abundant form found in mangrove ecosystem (Ramachandran *et al.*, 2008). This induced an increase of mangrove tree growth in impacted areas of both mangrove zones (Capdeville *et al.*, 2018). Besides, microbial communities involved in N-cycle like aerobic nitrifying bacteria participate to the recycling of ammonium from PW by the formation of nitrate in the first layers of mangrove sediments (Alongi *et al.*, 1992). Thus, nitrate can be uptake by mangrove trees (Ramachandran *et al.*, 2008) or completely removed from sediments through the denitrification activity under gaseous forms ( $N_2$ , NO,  $N_2O$ ) (Fernandes *et al.*, 2012). Ammonium can also be removed from sediments *via* anammox by anammox bacteria which release N under gaseous form ( $N_2$ ) (Li and Gu, 2013). However, the level of this metabolic pathway is low in mangrove ecosystem due to low nitrite concentration (Fernandes *et al.*, 2012) and decreases when temperature reach 37°C (Bertrand *et al.*, 2011). Therefore, it seemed more relevant to focus on the processes of nitrification and denitrification.

At short term (less than 19 months), PW discharges had no effect on the N-proportion in sediment while an increase of C-content was observed, only in *C. tagal* mangrove zone. This suggests a stronger resistance of sediment composition in the *R. mucronata* mangrove zone than in the *C. tagal* mangrove zone. As well, no resilience on N- and C-proportions were observed in both mangrove zones after 19 months without PW discharge. The N and C contents in C-IC and R-IC areas were still higher than in control areas but the curves of all areas seem to have reached an equilibrium state. The sediment content was more rapidly stable in depth and in *R. mucronata* mangrove zone and the N and C proportions were overall higher in this mangrove zone. This stability can be explained by the leaching of sediments during each tide which is more marked in *R. mucronata* mangrove zone than in the *C. tagal* one. Besides stability of mangrove sediments was confirmed by an absence of C:N ratio evolution overtime in all areas

whatever the layers and the mangrove zones. This indicates a similar microbial degradation of organic matter with or without PW discharges.

Although mangroves are rich in organic matter, they are deficient in nutrients (Boto and Wellington, 1984), particularly in nitrogen (Levy-Booth *et al.*, 2014) and phosphorous (Prasad, 2012). The PW rich in phosphorous (P) induced an immobilization of P only in the surface layer of *C. tagal* sediments in C-CI and C-II areas submitted to PW for 19 months. P cannot be removed from sediment under gaseous form like N, inorganic P can be up-taken by vegetation and organic P by microbial biomass. Several studies showed that this P-immobilization did not induced significant effect on the structure, production, nutrient content of mangrove trees whereas the microbial growth was enhanced (Tam *et al.*, 1998; Tam and Wong, 1996, 1995; Wong *et al.*, 1995). In contrast, for *R. mucronata* mangrove zone, an increase of P-proportion was observed in the 8-9 cm-layer of sediment from areas not impacted by PW (R-CC and R-IC areas). The P-content in R-IC area reached values in control area, indicating a resilience of sediment. P-content was surprisingly higher in areas without PW than in impacted areas. This phenomenon can be explained by a more important P uptake in the 8-9 cm-layer by the vegetation in areas exposed to PW. Indeed with PW, vegetation growth strongly increased (Capdeville *et al.*, 2018) thus mangrove trees need more of P for their growth. In the same experimental system, Herteman (2010) showed an immobilization of P in sediment beyond 60 cm of depth after 18 months of discharges, it would be relevant to measure the P-proportion such deep layer in sediment after 9 years of discharges.

#### 4.2. Total density of bacteria

Our results highlighted an influence of PW inputs and environmental conditions on bacteria densities. It is known that mangrove microbial communities are strongly influenced by the environmental parameters like temperature, humidity, pH (Alongi *et al.*, 1992), salinity (Tam, 1998), C:N ratio, dissolved oxygen and nutrient concentrations (Li and Gu, 2013). Besides, the presence of aerobic and anaerobic bacteria depends on the oxygen level in sediments which is modulated by the tides, the bioturbation activity, and the presence of mangrove tree roots (Ramachandran *et al.*, 2008). These biotic and abiotic parameters can modify the composition and abundance of bacteria in mangrove sediments (Chakraborty *et al.*, 2015). The effects of wastewaters can be both direct and indirect, *via* modification of environmental parameters.

In the *C. tagal* mangrove zone PW induce an increase in bacterial density after 8.5 years of discharges. In contrast, they seem to decrease bacterial density in the *R. mucronata* mangrove zone. The bacterial communities seem to be more resilient and resistant in this latter mangrove zone. However, at short term (12 months) bacterial density increased in both *C. tagal* and *R. mucronata* areas. Several studies reported similar increases on the bacterial density in microcosms (Tam, 1998) and mangrove areas exposed to wastewaters (Tam *et al.*, 2009; Wickramasinghe *et al.*, 2009; Bouchez *et al.*, 2013). Nevertheless, Luo *et al.* (2017) observed an increase of fungal density at the detriment of bacterial density in mangrove sediments exposed to nitrogen inputs. Bacterial diversity could also be modified by the PW. This aspect was not tested in this study but was described by Chakraborty *et al.* (2015) for bacteria exposed to differential anthropogenic inputs. The nutrient inputs in the mangrove areas of the present study could select and promote bacteria involved in bio-epuration of wastewaters. In this sense, Fernandes *et al.* (2014) studied the bacterial community composition and revealed an increase of Gammaproteobacteria abundance and diversity in mangrove disturbed by anthropogenic inputs, suggesting the possibility that Gammaproteobacteria would contribute to the modulation of a nitrate excess.

No resilience was observed in C-IC and R-IC areas on the number of 16S *rDNA* gene copies after 12 months without discharge in both mangrove zone, but these areas seem to evolve differently than the impacted areas. An assessment at more long-term would be relevant to determine the bacterial evolution without discharge.

#### 4.3. Density of functional groups involved in N-cycle

As it was shown with the density of total bacteria, the densities of denitrifying bacteria, nitrifying bacteria and archaea were influenced both by PW and by environmental constraints. The abundances of denitrifying bacteria having the gene *nosZ* clade I were higher in impacted areas of *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones than in control areas, after 8.5 years of PW discharges. At short term, the increase in density was faster in the *C. tagal* mangrove zone (appeared after 8 months) than in *R. mucronata* mangrove zone (appeared after 12 months). Similar results were observed in other mangroves impacted by the wastewaters (Tam, 1998; Tam *et al.*, 2009; Wickramasinghe *et al.*, 2009; Bouchez *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2017). The N-inputs in mangrove sediments induced an increase of abundance of bacteria involved in N-elimination. This led to a stimulation of the potential denitrification activity in impacted areas

of both mangrove zones, as it was demonstrated by Kristensen *et al.* (1998). Consistently with the results obtained for the abundance of *nosZ* clade I gene copies, the short-term impact on denitrification activity was revealed after 8 months in both mangrove zones and was faster in *C. tagal* mangrove zone than in *R. mucronata* mangrove zone.

These results are consistent with the stability of N-proportion of sediments in impacted areas despite continuous inputs of PW. This was likely due to the N-elimination by denitrifying bacteria. In a mangrove exposed to shrimp effluents, all N-cycling processes were stimulated between 2 and 12-fold (Molnar *et al.*, 2013). The denitrification can be also favored by the bioturbation activity of crab present in these areas (Capdeville *et al.*, 2018). Indeed the crab promote the entry of oxygen in depth which stimulate the production of nitrate *via* the nitrification and favor the transformation of nitrate into N<sub>2</sub> *via* the denitrification during anoxia period (Kristensen *et al.*, 1998).

In terms of resilience, a clear effect of the interruption of PW discharge was observed on the potential DEA while no clear trends could be observed on the abundance of denitrifying bacteria. It is possible that these bacteria are still present in the sediment but are less active. An analysis of *nosZ* clade I gene transcript with RT-QPCR could explain these results.

In this study, the community of nitrifiers was dominated by the archaea (AOA) rather than by the bacteria (AOB), as described in marine ecosystems by Nicol and Schleper (2006). For the two groups of microorganisms, the results showed a variation of the abundance of *amoA* gene overtime in all areas of the two mangrove zones. Cao *et al.* (2011) revealed the presence of AOA and AOB in polluted mangrove sediments, with higher abundance of the AOA but higher diversity of the AOB. According to these authors, the abundances of AOA and AOB were correlated with the pH and the temperature while the AOA:AOB ratio was correlated with the ammonium concentration (Cao *et al.*, 2011). However, in the present study, in impacted areas submitted to high concentrations of ammonium the AOA:AOB ratio was not correlated to the ammonium concentration. Indeed, the AOA:AOB ratio should be higher in impacted area linked to the input of ammonium by the PW discharge, however, the AOA:AOB ratio was similar in control and impacted areas, for both mangrove zone. The ratio values increase between November 2015 (after T0 + 3 weeks) and January 2016 (after T0 + 3 months), then decrease overtime in both areas. Besides, the AOA:AOB ratio in C-IC and C-CI areas was stable overtime and did not follow the ammonium concentration. The same observation was revealed in *R. mucronata* mangrove zone. For the *C. tagal* mangrove zone, after 8.5 years, the

abundances of AOA and AOB were always higher in presence of PW discharge. In contrast, at short term, only the AOA abundance increased. The AOB seem to be more resistant than the AOA in *C. tagal* mangrove zone. For the *R. mucronata* mangrove zone, no long-term effect was observed on the AOB and AOA abundances but a short-term effect tended to appear very early, after 3 months of exposure for the AOB and more for the AOA (after 12 months). In contrast with the *C. tagal* mangrove zone, the AOA seem to be more resistant than the AOB in *R. mucronata* mangrove zone. Besides the AOA would be more resilient than the AOB in *R. mucronata* mangrove zone. In the literature, the nitrifying communities of mangrove sediment were also stimulated by the wastewaters (Tam, 1998; Tam *et al.*, 2009; Wickramasinghe *et al.*, 2009; Bouchez *et al.*, 2013) without any effect on the nitrifying structure (Tam *et al.*, 2009; Wickramasinghe *et al.*, 2009). Similarly, an amendment of ammonium on mangrove sediment stimulated the growth of AOA and AOB whereas an amendment of nitrite inhibited them (Li and Gu, 2013). However both amendments altered the composition of AOA and AOB (Li and Gu, 2013). It would be relevant to study the composition of AOA and AOB in presence of wastewaters in the mangrove areas of the present study. The nitrification process occurs at the surface of sediment or in micro-oxic zones generated by the mangrove tree roots and the sediment turnover carry out by the bioturbation of crab (Ramachandran *et al.*, 2008). The presence of nitrifying communities in sediments could be explained the N-elimination from sediments in impacted areas thanks to the coupling of nitrification and denitrification. Notwithstanding these results must be confirmed because the nitrification activity cannot be measured in these areas. But the nitrification activity seemed to be increased with the wastewaters presence (Kristensen *et al.*, 1998; Ramachandran *et al.*, 2008).

#### 4.4. Structure of microbial photosynthetic communities

Results obtained with the similarities between impacted and control areas showed a long-term impact on photosynthetic pigment concentrations in *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones. This indicates that the structure of microbial communities was influenced by the PW discharges and was different that the structure in control areas. Several studies demonstrated that the phototrophs like the green algae, diatoms and cyanobacteria were stimulated in mangrove sediment exposed to wastewaters (Bouchez *et al.*, 2013; Tam *et al.*, 2009; Wickramasinghe *et al.*, 2009). It would be relevant to determine the diversity of microbial phototrophic communities in function of the wastewater presence. The phototrophs can be impacted directly by the PW but also indirectly by the modification of their environment by the



discharges. Indeed, the PW induced a strong growth of mangrove trees resulting on a canopy closure and thus a decrease of light intensity at the sediment surface (Capdeville *et al.*, 2018). This decrease of light can strongly affect the phototrophs. Then, the nutrient inputs induced an increase of microbial activity which may contribute to the anoxia of sediment (Brzezinska *et al.*, 2006) harmful for several phototrophs. Indeed the denitrification activity, which is possible only in anaerobic condition, was stimulated by the PW discharge, being evidence of a decrease of oxygen concentration in sediment. Besides lower chl *a* concentration in C-II area than in C-CC area could be induced modifications in microphytobenthos biomass and composition (MacIntyre *et al.*, 1996). The results based on pigment analysis highlighted an increase of green algae and cyanobacteria due to an increase of chlorophyll *b*, lutein and zeaxanthin in impacted areas of both mangrove zone. But the stimulation of this organisms could decrease the development area of other organisms. Indeed, a decrease of fucoxanthin in R-II area suggested a lower number of diatoms in this area compared to control area.

At short term the PW induced a change in phototrophs structure only in *C. tagal* mangrove zone which makes this mangrove zone less resistant than the *R. mucronata* mangrove zone. The latter was also more resilient than the *C. tagal* mangrove zone. Indeed a resilience was observed after 8 months only in *R. mucronata* mangrove zone. This resilience can be explained by the stronger exposition of this mangrove zone to the tides. Sediment was more leached favoring the elimination of nutrient excess in this old impacted area.

These results can be nuanced because the phototrophs were quantified by the measure of pigment concentrations. But these pigment presences can be linked to the phototroph and mangrove leaf presence. The litter production was enhanced with PW presence (Capdeville *et al.*, 2018), the chlorophyll *a* into leaves, for example, could be added to the total chlorophyll *a* concentration in sediment and influenced the results of phototroph quantification. However the litter was rapidly trapped and consumed by the crabs feeding on leaves (Botto *et al.*, 2006; Camilleri, 1992).

## 5. Conclusion

This study revealed the long-term impact of PW on microbial communities from both mangrove zones, resulting on higher densities of total bacteria, denitrifying bacteria, AOA, and AOB. Besides the PW induced an increase of microbial activities, particularly in denitrification

activity and a modification of microbial photosynthetic community structure. The responses of microbial communities from *C. tagal* and *R. mucronata* mangrove zones to the short-term impact was different along the mangrove zone. It was similar for the resilience capacities of microbial communities. Each response is unique and depends on the mangrove zone. The *R. mucronata* mangrove zone, which is more buffered by tides, seems to be more resistant and resilient than the *C. tagal* mangrove zone. The short-term impact and the resilience were overall observed first on the denitrification activity (after 8 months) and second on the microbial abundances (after 12 months). It would be relevant to determine the diversity of microbial communities to see the potential impact of PW on microbial structure and their resilience capacities. Although the microbial structure can be modified, the microorganisms maintain the microbial function in mangrove sediment thanks to their functional redundancy. The resilience is thus associated to a functional recovery. Besides the microbial activity and the vegetation uptake seem remove efficiently the C, N and P nutrients from wastewaters accumulated in sediments. The equilibrium state was faster to reach in *R. mucronata* mangrove zone. This confirms the strong potential of microbial communities from *R. mucronata* mangrove zone in bio-epuration of PW. To our knowledge, this is the first time that the resilience capacity of microbial community was studied *in situ* in both mangrove zone after a long-term exposure to PW discharges.

## 6. Acknowledgements

We are grateful to the Water Syndicate of Mayotte (SIEAM) for the maintenance of the experimental system and the coastal conservatory of Mayotte for the study site. This work was supported by the Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA, grant n°2014/03) and the SIEAM (agreement with CNRS n°111098).

## 7. Bibliographic references

- Alongi, D. m., Boto, K. g., Robertson, A. i., 1992. Nitrogen and Phosphorus Cycles, in: Robertson, A.I., Alongi, D.M. (Eds.), Tropical Mangrove Ecosystems. American Geophysical Union, pp. 251–292. <https://doi.org/10.1029/CE041p0251>
- Alongi, D.M., 2009. Paradigm shifts in mangrove biology. Coast. Wetl. Integr. Ecosyst. Approach Elsevier Amst. Países Bajos P 615–640.
- Barlow, R.G., Cummings, D.G., Gibb, S.W., 1997. Improved resolution of mono- and divinyl chlorophylls a and b and zeaxanthin and lutein in phytoplankton extracts using reverse

- phase C-8 HPLC. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 161, 303–307.  
<https://doi.org/10.3354/meps161303>
- Bertrand, J.C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P., 2011. *Ecologie microbienne: Microbiologie des milieux naturels et anthropisés*. Press. Univ. Pau Pays Adour.
- Boto, K.G., Wellington, J.T., 1984. Soil characteristics and nutrient status in a Northern Australian mangrove forest. *Estuaries* 7, 61–69. <https://doi.org/10.2307/1351957>
- Botto, F., Iribarne, O., Gutierrez, J., Bava, J., Gagliardini, A., Valiela, I., 2006. Ecological importance of passive deposition of organic matter into burrows of the SW Atlantic crab *Chasmagnathus granulatus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 312, 201–210.
- Bouchez, A., Pascault, N., Chardon, C., Bouvy, M., Cecchi, P., Lambs, L., Herteman, M., Fromard, F., Got, P., Leboulanger, C., 2013. Mangrove microbial diversity and the impact of trophic contamination. *Mar. Pollut. Bull.* 66, 39–46.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.015>
- Brzezinska, M., Tiwari, S.C., Stepniewska, Z., Nosalewicz, M., Bennicelli, R.P., Samborska, A., 2006. Variation of enzyme activities, CO<sub>2</sub> evolution and redox potential in an Eutric Histosol irrigated with wastewater and tap water. *Biol. Fertil. Soils* 43, 131–135. <https://doi.org/10.1007/s00374-006-0113-6>
- Camilleri, J.C., 1992. Leaf-litter processing by invertebrates in a mangrove forest in Queensland. *Mar. Biol.* 114, 139–145. <https://doi.org/10.1007/BF00350863>
- Cao, H., Li, M., Hong, Y., Gu, J.-D., 2011. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in polluted mangrove sediment. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 513–523.
- Capdeville, C., Abdallah, K., Buffan-Dubau, E., Lin, C., Azemar, F., Lambs, L., Fromard, F., Rols, J.-L., Leflaive, J., 2018. Limited impact of several years of pretreated wastewater discharge on fauna and vegetation in a mangrove ecosystem. *Mar. Pollut. Bull.* in press.
- Chakraborty, A., Bera, A., Mukherjee, A., Basak, P., Khan, I., Mondal, A., Roy, A., Bhattacharyya, A., SenGupta, S., Roy, D., Nag, S., Ghosh, A., Chattopadhyay, D., Bhattacharyya, M., 2015. Changing bacterial profile of Sundarbans, the world heritage mangrove: Impact of anthropogenic interventions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 593–610. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1814-5>
- Dias, A.C.F., Silva, M. de C.P. e, Cotta, S.R., Dini-Andreote, F., Soares, F.L., Salles, J.F., Azevedo, J.L., Elsas, J.D. van, Andreote, F.D., 2012. Abundance and Genetic Diversity of nifH Gene Sequences in Anthropogenically Affected Brazilian Mangrove Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7960–7967.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.02273-12>
- Fernandes, S.O., Kirchman, D.L., Michotey, V.D., Bonin, P.C., LokaBharathi, P.A., 2014. Bacterial diversity in relatively pristine and anthropogenically-influenced mangrove ecosystems (Goa, India). *Braz. J. Microbiol.* 45, 1161–1171.  
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000400006>
- Fernandes, S.O., Michotey, V.D., Guasco, S., Bonin, P.C., Loka Bharathi, P.A., 2012. Denitrification prevails over anammox in tropical mangrove sediments (Goa, India). *Mar. Environ. Res.* 74, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.11.008>
- Ganguly, D., Dey, M., Sen, S., Jana, T.K., 2009. Biosphere-atmosphere exchange of NO<sub>x</sub> in the tropical mangrove forest. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 114, G04014.  
<https://doi.org/10.1029/2008JG000852>
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron.* 4, 1–9.

- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., Philippot, L., 2006. Quantitative Detection of the nosZ Gene, Encoding Nitrous Oxide Reductase, and Comparison of the Abundances of 16S rRNA, narG, nirK, and nosZ Genes in Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5181–5189. <https://doi.org/10.1128/AEM.00231-06>
- Herteman, M., 2010. Evaluation des capacités bioremédiatrices d'une mangrove impactée par des eaux usées domestiques. Application au site pilote de Malamani, Mayotte. PHD Toulouse Université Paul Sabatier.
- Herteman, M., Fromard, F., Lambs, L., 2011. Effects of pretreated domestic wastewater supplies on leaf pigment content, photosynthesis rate and growth of mangrove trees: A field study from Mayotte Island, SW Indian Ocean. *Ecol. Eng.* 37, 1283–1291. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.03.027>
- Huang, Y., Ou, D., Chen, S., Chen, B., Liu, W., Bai, R., Chen, G., 2017. Inhibition effect of zinc in wastewater on the N<sub>2</sub>O emission from coastal loam soils. *Mar. Pollut. Bull.* 116, 434–439. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.030>
- Kristensen, E., Jensen, M.H., Banta, G.T., Hansen, K., Holmer, M., King, G.M., 1998. Transformation and transport of inorganic nitrogen in sediments of a southeast Asian mangrove forest. *Aquat. Microb. Ecol.* 15, 165–175. <https://doi.org/10.3354/ame015165>
- Lambs, L., Léopold, A., Zeller, B., Herteman, M., Fromard, F., 2011. Tracing sewage water by 15N in a mangrove ecosystem to test its bioremediation ability. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 2777–2784. <https://doi.org/10.1002/rcm.5120>
- Levy-Booth, D.J., Prescott, C.E., Grayston, S.J., 2014. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. *Soil Biol. Biochem.* 75, 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.021>
- Li, M., Cao, H., Hong, Y., Gu, J.-D., 2011. Spatial distribution and abundances of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in mangrove sediments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1243–1254.
- Li, M., Gu, J.-D., 2013. Community structure and transcript responses of anammox bacteria, AOA, and AOB in mangrove sediment microcosms amended with ammonium and nitrite. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9859–9874.
- Luo, L., Meng, H., Wu, R., Gu, J.-D., 2017. Impact of nitrogen pollution/deposition on extracellular enzyme activity, microbial abundance and carbon storage in coastal mangrove sediment. *Chemosphere* 177, 275–283. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.027>
- MacIntyre, H.L., Geider, R.J., Miller, D.C., 1996. Microphytobenthos: The ecological role of the “secret garden” of unvegetated, shallow-water marine habitats. I. Distribution, abundance and primary production. *Estuaries* 19, 186–201. <https://doi.org/10.2307/1352224>
- Molnar, N., Welsh, D.T., Marchand, C., Deborde, J., Meziane, T., 2013. Impacts of shrimp farm effluent on water quality, benthic metabolism and N-dynamics in a mangrove forest (New Caledonia). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 117, 12–21.
- Nicol, G.W., Schleper, C., 2006. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends Microbiol.* 14, 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.03.004>
- Philippot, L., Andert, J., Jones, C.M., Bru, D., Hallin, S., 2011. Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N<sub>2</sub>O emissions from soil. *Glob. Change Biol.* 17, 1497–1504. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02334.x>
- Prasad, M.B.K., 2012. Nutrient stoichiometry and eutrophication in Indian mangroves. *Environ. Earth Sci.* 67, 293–299. <https://doi.org/10.1007/s12665-011-1508-8>

- Ramachandran, P., Ramachandran, R., K Ray, A., Rixen, T., 2008. Nitrogen cycling: A review of the processes, transformations and fluxes in coastal ecosystems. *Curr. Sci.* 94.
- Rothauwe, J.H., Witzel, K.P., Liesack, W., 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4704–4712.
- Sørensen, J., 1978. Denitrification Rates in a Marine Sediment as Measured by the Acetylene Inhibition Technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 36, 139–143.
- Tam, N.F.Y., 1998. Effects of wastewater discharge on microbial populations and enzyme activities in mangrove soils. *Environ. Pollut.* 102, 233–242.  
[https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(98\)00084-0](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(98)00084-0)
- Tam, N.F.Y., Wong, A.H.Y., Wong, M.H., Wong, Y.S., 2009. Mass balance of nitrogen in constructed mangrove wetlands receiving ammonium-rich wastewater: Effects of tidal regime and carbon supply. *Ecol. Eng., Wetland restoration and ecological engineering* 35, 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.05.011>
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 1996. Retention and distribution of heavy metals in mangrove soils receiving wastewater. *Environ. Pollut.* 94, 283–291.
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 1995. Mangrove soils as sinks for wastewater-borne pollutants. *Hydrobiologia* 295, 231–241. <https://doi.org/10.1007/BF00029130>
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., Lan, C.Y., Wang, L.N., 1998. Litter production and decomposition in a subtropical mangrove swamp receiving wastewater. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 226, 1–18. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(97\)00233-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(97)00233-5)
- Wickramasinghe, S., Borin, M., Kotagama, S.W., Cochard, R., Anceno, A.J., Shipin, O.V., 2009. Multi-functional pollution mitigation in a rehabilitated mangrove conservation area. *Ecol. Eng.* 35, 898–907. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.021>
- Wong, Y.S., Lan, C.Y., Chen, G.Z., Li, S.H., Chen, X.R., Liu, Z.P., Tam, N.F.Y., 1995. Effect of wastewater discharge on nutrient contamination of mangrove soils and plants. *Hydrobiologia* 295, 243–254. <https://doi.org/10.1007/BF00029131>
- Wu, Y., Chung, A., Tam, N.F.Y., Pi, N., Wong, M.H., 2008. Constructed mangrove wetland as secondary treatment system for municipal wastewater. *Ecol. Eng.* 34, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.07.010>



## **Chapitre 7 : Conclusions, discussion générale et perspectives**





## 1. Conclusions

La problématique actuelle de gestion de l'assainissement des eaux usées domestiques (EUD) en zone insulaire nous a conduits à nous interroger sur l'utilisation de la mangrove comme réceptacle final des EUD prétraitées. Face à l'explosion démographique de l'île de Mayotte et l'augmentation du volume d'eaux usées à traiter, il est indispensable de trouver des moyens pour éviter le déversement direct de ces eaux dans le lagon et protéger sa biodiversité. Un site d'expérimentation a donc été mis en place dans la mangrove de Malamani. Devant le manque de données permettant de statuer sur l'impact potentiel de ces eaux usées sur la mangrove d'une part, mais plus précisément sur ses compartiments principaux (végétation, faune, sédiments), nous avons mis en place des études expérimentales *in situ* couplées à des analyses au laboratoire permettant d'approfondir les connaissances scientifiques dans ce domaine et d'apporter des éléments de réponse à destination des gestionnaires de l'assainissement et du milieu littoral.

Le premier axe de mes travaux de thèse a porté sur l'étude de la résistance de la mangrove après un apport anthropique continu à long-terme. Cette partie de l'étude consistait à suivre la végétation, la macrofaune benthique (crabe et méiofaune) et la microflore des sédiments après une exposition de 4,5 à 6,5 ans aux rejets d'EUD prétraitées. Une parcelle de mangrove a été suivie dans deux faciès de végétation différents, le faciès à *Ceriops tagal* et le faciès à *Rhizophora mucronata*. Ces travaux ont permis de montrer que l'apport d'eau douce et de nutriments a modifié la physico-chimie des sédiments, et a fortement affecté les palétuviers et les organismes benthiques. Un schéma conceptuel a été réalisé pour mettre en évidence les effets directs et indirects des EUD sur la mangrove (**Figure 25**).

Le compartiment végétation est constitué de deux faciès de végétation soumis à des contraintes environnementales différentes. Le faciès *C. tagal* est plus éloigné du lagon, moins exposé aux marées. Il est donc soumis à de plus fortes conditions de salinité et d'aridité. Le faciès *R. mucronata* est quant à lui moins contraint par la salinité et l'aridité, étant plus tamponné par les marées qui en revanche provoquent des périodes d'anoxie plus longues. La végétation a été étudiée d'un point de vue macroscopique et biochimique. Les EUD prétraitées ont induit une augmentation de l'ensemble des paramètres de croissance des palétuviers (diamètre, hauteur, aire basale, biomasse aérienne et souterraine, surface foliaire) ainsi que leur productivité (litière de feuilles) et le nombre de régénérations. Une croissance plus importante des arbres a été observée dans le faciès *C. tagal* tandis qu'une diminution de la densité d'arbres et une augmentation de la mortalité des palétuviers ont été montrées dans le faciès *R. mucronata*. D'un

point de vue biochimique, les EUD ont induit une forte stimulation de l'activité photosynthétique des feuilles, traduite par une augmentation du contenu pigmentaire. Différents ratio pigmentaires ont permis de révéler une adaptation des feuilles à l'apport de nutriments et aux modifications induites sur la canopée. Cette augmentation pigmentaire dans les zones impactées s'est traduite par l'apparition de tâches d'un vert plus intense au niveau de la canopée visible par des photographies satellites et une augmentation de l'index NDVI (*Normalized Difference Vegetation Index*).

Les crabes font partie des espèces ingénieurs indispensables au bon fonctionnement de la mangrove. La mangrove étudiée est composée de 2 communautés de crabes : les Sesarmidae (les plus abondants) et les Ocypodidae. Bien qu'aucune influence des EUD n'ait été observée sur la densité de crabes au bout de 6,5 ans, il a été montré une modification de la structure de la communauté de crabes caractérisée par une diminution de la diversité (augmentation des proportions de Sesarmidae au détriment des Ocypodidae). Puisque aucune mortalité des crabes liée aux EUD n'a été observée, il a été suggéré que les espèces non tolérantes à l'exposition aux EUD migreraient en dehors des zones de rejets. Au bout de 9,5 ans de rejets dans les parcelles de mangrove, les effets des EUD sur la diversité se sont accentués et un impact sur la densité de crabes et de terriers est apparu dans les deux faciès de végétation.

Les capacités de résistance à une perturbation anthropique de 4,5 ou 6,5 ans ont également été évaluées pour la méiofaune seulement dans le faciès *C. tagal*. Ce groupe rassemble de petits organismes vivant dans les sédiments et appartenant aussi aux groupes des espèces ingénieurs de la mangrove. La méiofaune de Malamani est principalement composée de nématodes et de copépodes, mais elle comprend quelques individus appartenant à des taxons rares. En présence d'un excès d'eau douce et de nutriments, la structure de la méiofaune est modifiée alors que la densité et la biomasse totale sont inchangées. En revanche, la proportion des taxons rares a été négativement impactée par les EUD. Une étude plus approfondie sur les groupes trophiques et les morphotypes des nématodes a révélé des changements dans leur structure sans impacter l'abondance et la biomasse des nématodes.

Enfin, cette étude a permis de comparer les conséquences de 5 années de rejets d'EUD sur la structure, la densité et l'activité des communautés microbiennes dans les parcelles impactées des faciès *C. tagal* et *R. mucronata*. Les résultats ont montré un effet à la fois de la saisonnalité, du faciès de végétation et du rejet des EUD sur la structure des communautés microbiennes (plus particulièrement dans le faciès *R. mucronata*). La diversité est également impactée par les paramètres environnementaux tels que la lumière, la température et la concentration en

phosphate. Les densités microbiennes totales n'ont pas été influencées par les EUD après 5 années d'exposition bien qu'une tendance à l'augmentation peut être observée dans le faciès *R. mucronata*. Cette tendance s'est confirmée au bout de 8,5 années. En effet, les densités totales ont été augmentées en présence des EUD dans les deux faciès de végétation. L'étude des microorganismes impliqués dans le cycle de l'azote des deux faciès de végétation a montré une stimulation des bactéries dénitrifiantes en présence des EUD depuis 5 ou 8,5 ans, ce qui s'est traduit par une augmentation de leur diversité, de leur densité et de leur activité en lien avec une augmentation des proportions de carbone et d'azote plus élevées dans les sédiments impactés par les EUD. De plus les EUD ont modifié la structure des communautés d'archées (AOA) et de bactéries (AOB) nitrifiantes après 5 ans de rejet. Malgré la dominance des AOA par rapport aux AOB, seule la densité des AOB a été augmentée par les EUD. Cependant, au bout de 8,5 années, les abondances des AOA et des AOB ont été plus élevées dans les parcelles impactées du faciès *C. tagal* suggérant qu'à plus long terme le faciès *R. mucronata* semble plus résistant aux EUD que le faciès *C. tagal*. Concernant les communautés microbiennes photosynthétiques, une modification de leur structure a été observée en présence des EUD depuis 8,5 années, certainement en raison d'une plus grande disponibilité en phosphore dans les sédiments de surface.

Cette étude a permis de révéler les effets directs des EUD sur les différents compartiments de la mangrove mais les EUD peuvent également induire des effets indirects sur la faune et les communautés microbiennes par des changements dans les conditions environnementales tels qu'une baisse de la concentration en oxygène dans les sédiments ou une modification de la source de nourriture, ou une augmentation de la croissance végétale qui accroît la quantité de litière au sol, diminue la température et la luminosité sous la canopée.

Le deuxième axe de recherche de ma thèse a porté sur les capacités de résistance à court-terme des différents compartiments de la mangrove exposés aux EUD. Le suivi de la végétation, des crabes et de la communauté microbienne a été effectué pendant 24 mois après le début des rejets dans les parcelles *C. tagal* et *R. mucronata* (à T0, après 3 semaines, 3, 8, 12, 19, et 24 mois). Tout comme après un impact à long-terme, après une exposition à court-terme, les EUD prétraitées ont induit une augmentation de l'index NDVI (dès 23 mois), de la surface foliaire (19 mois) et des concentrations en pigment (12 mois) des deux faciès de végétation. Le faciès

*C. tagal* était également plus impacté par les rejets soulignant une résistance plus marquée dans le faciès *R. mucronata*.

Le suivi des crabes a également été réalisé à court-terme. Contrairement aux observations à long-terme, les EUD ont induit une diminution de la densité de crabes (18 mois) qui est plus intense dans le faciès *C. tagal*. La diminution de la diversité induite par les EUD s'est avérée également plus importante dans le faciès *C. tagal* (12 mois) que dans le faciès *R. mucronata* (18 mois). Ces résultats reflètent des capacités de résistance plus importantes des communautés de crabes dans le faciès *R. mucronata*.

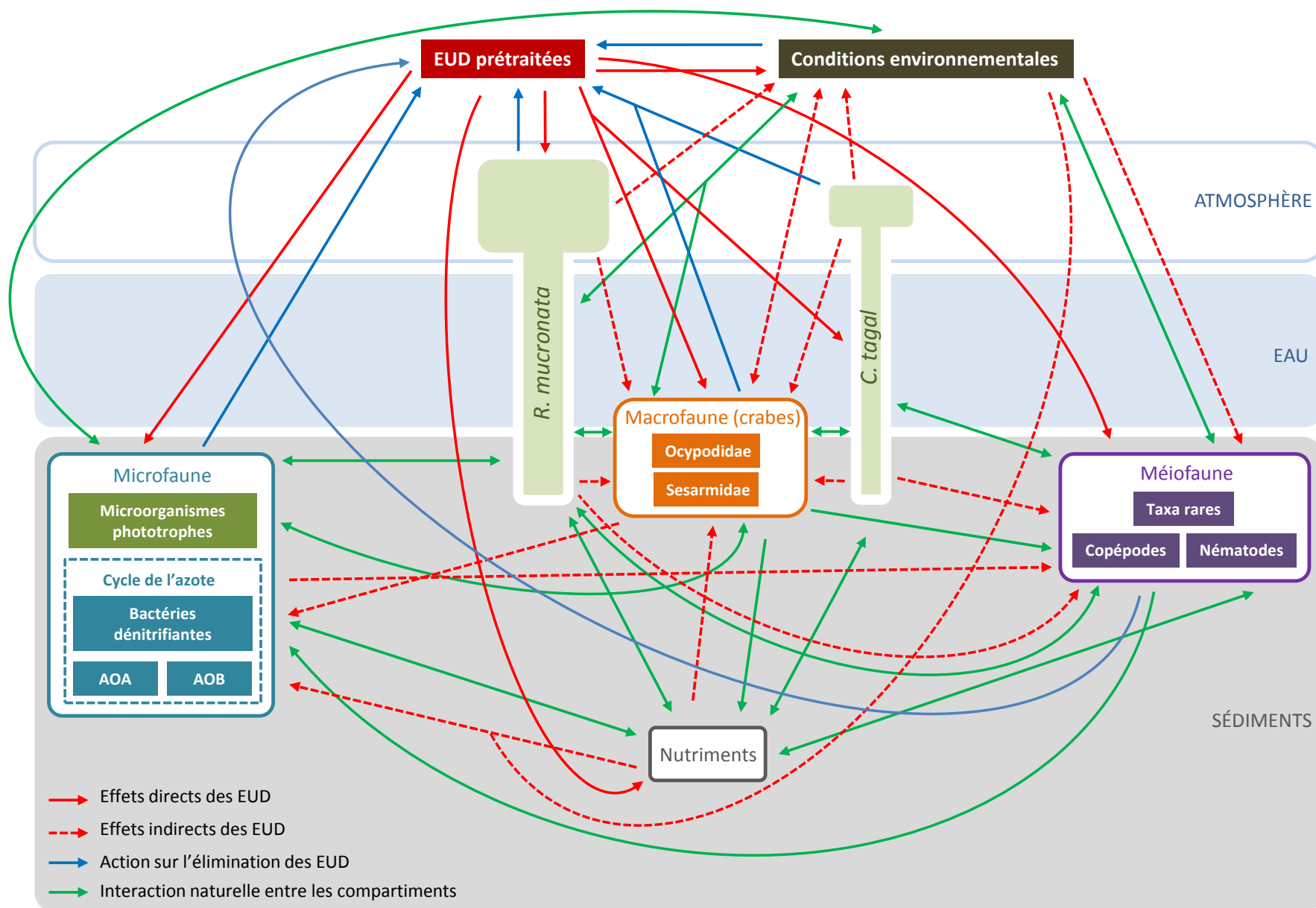
Sachant que les microorganismes réagissent rapidement aux changements dans leur environnement, il était intéressant d'étudier leur réponse à une perturbation par les EUD à court-terme. La structure des phototrophes a été modifiée uniquement dans le faciès *C. tagal* après 8 mois de rejets. Tout comme dans l'étude à long-terme, une augmentation de la densité totale a été mise en évidence après 12 mois dans les deux faciès de végétation. L'augmentation de la densité des bactéries dénitrifiantes était plus rapide dans les parcelles impactées du faciès *C. tagal* (après 8 mois) que dans le faciès *R. mucronata*. Une augmentation de la dénitrification potentielle a également été observée au bout de 8 mois d'exposition aux EU. L'impact était plus marqué dans le faciès *C. tagal*. La composition des nitrifiantes était dominée par l'abondance des AOA. Ces dernières ont été stimulées dans les parcelles impactées des deux faciès de végétation au bout de 12 mois. En revanche, la densité des AOB n'a été modifiée par l'impact à court-terme que dans le faciès *R. mucronata*. La réponse des sédiments à l'impact à court-terme s'est traduite par une augmentation de la proportion du carbone et du phosphore uniquement dans le faciès *C. tagal*. L'ensemble des résultats a démontré une plus forte résistance à court-terme des communautés microbiennes dans le faciès *R. mucronata*.

Le troisième axe de recherche de ma thèse a permis de déterminer les capacités de résilience à court-terme de parcelles de mangrove préliminairement exposées à un excès de nutriments et d'eau douce pendant 7,5 ans. Les rejets ont alors été arrêtés dans ces parcelles, puis les capacités de résilience des faciès de végétation *C. tagal* et *R. mucronata* ont été comparées pour la végétation, la macrofaune (crabe) et la microfaune. Cette partie de l'étude a été réalisée sur la même période de suivi que l'étude de l'impact des EUD à court-terme. Les paramètres étudiés pour la végétation ont montré une résilience plus marquée dans le faciès *R. mucronata* que dans

le faciès *C. tagal*. Cette capacité des palétuviers s'est traduite par une diminution de la surface foliaire et du contenu pigmentaire après 19 mois sans rejet et du NDVI après 23 mois.

Les capacités de résilience ont ensuite été mesurées pour les crabes. Il a été observé un retour aux valeurs contrôles dès 18 mois sans rejet pour la densité et la diversité, et à 24 mois pour la composition spécifique de crabes dans le faciès *C. tagal* uniquement. Néanmoins, au bout de 24 mois, il n'a pas été observé de retour des proportions de Sesarmidae et d'Ocypodidae et de la densité de terriers aux valeurs initiales.

La résilience des communautés microbiennes a été évaluée dans les deux faciès de végétation. Concernant le faciès *C. tagal*, aucune résilience n'a été observée dans la structure des phototrophes, la densité totale, et la densité des groupes fonctionnels (dénitrifiantes, AOA et AOB). Seule une diminution de l'activité de dénitrification a été observée au bout de 8 mois dans ce faciès. Le faciès *R. mucronata* s'est montré plus résilient que le faciès *C. tagal*. Bien qu'aucune résilience n'ait été observée sur la densité totale et la densité des AOB, la résilience s'est traduite par une diminution de la densité et de l'activité des dénitrifiantes au bout de 8 mois sans rejets, et une diminution de la densité des AOA. Aucune résilience n'est observée au niveau des proportions de carbone et d'azote au bout de 19 mois mais le contenu sédimentaire se stabilise rapidement. Les sédiments se stabilisent plus rapidement en profondeur et dans le faciès *R. mucronata* que dans le faciès *C. tagal*.



**Figure 25.** Schéma conceptuel illustrant (i) les interactions naturelles existant entre les compartiments de la mangrove : la végétation (palétuviers *Rhizophora mucronata* et *Ceriops tagal*), la faune (crabes et méiofaune), l'eau et les sédiments contenant les communautés microbiennes, les nutriments contenus dans les sédiments et les conditions environnementales (paramètres abiotiques et biotiques définissant l'environnement autre que les nutriments) (flèches vertes), (ii) les effets directs (flèches rouges) et indirects (flèches rouges pointillées) des eaux usées domestiques (EUD) prétraitées rejetées dans la mangrove, et (iii) les actions des différents acteurs de la mangrove sur l'élimination des EUD. AOA : archées oxydant l'ammonium, AOB : bactéries oxydant l'ammonium.





## 2. Discussion générale

Mes travaux de thèse se sont inscrits dans le contexte global de la gestion de l'assainissement des EUD d'une part, et d'autre part dans le contexte de la préservation des écosystèmes littoraux. Les mangroves jouent un rôle prépondérant dans le fonctionnement de ces écosystèmes car elles leur fournissent un grand nombre de services écosystémiques (Lee *et al.*, 2014; Mohamed *et al.*, 2016). Cependant, elles constituent un écosystème fragile qui peut être perturbé par les activités humaines (Giri *et al.*, 2011). La plupart des études sur les mangroves et la problématique de pollution se focalisent sur un unique processus, ou un seul compartiment de façon à en comprendre le fonctionnement de la manière la plus précise possible. Cette approche est indispensable pour détailler le rôle des compartiments et de chacun des processus dans le fonctionnement d'un écosystème. Mais aucun d'eux ne fonctionne de manière isolée sans interaction avec les autres compartiments. Afin d'étudier l'impact potentiel des EUD prétraitées sur l'écosystème de la mangrove, il est nécessaire de comprendre les réponses de chacun des compartiments pour élucider le fonctionnement global de l'écosystème. Le fonctionnement de la mangrove est complexe, elle est soumise à de nombreuses interactions biotiques et abiotiques spécifiques au contexte tropical et côtier. Les compartiment végétation, faune, sédiment et eau sont en constante interaction et maintiennent l'équilibre fonctionnel de la mangrove (**Figure 25**). Pour conserver cet équilibre, aucun de ces compartiments ne doit subir de modifications importantes, qu'elles proviennent de perturbations globales (changement climatique et montée des eaux par exemple) ou locales (comme l'apport d'eaux usées domestiques).

Composée d'espèces strictement adaptées à ce milieu, la végétation constitue le compartiment structurant de l'écosystème mangrove. Elle apporte une source de nourriture et des niches écologiques propices à la faune carcinologique et benthique. La réponse du compartiment végétation en présence d'EUD dépend des espèces de palétuviers qui le composent. Parmi les effets des EUD sur la végétation, l'apport d'eau pourrait entraîner une durée d'immersion plus longue et ainsi impacter les palétuviers. Cependant, dans le cas de notre étude, les quantités d'eaux apportées sont trop faibles ( $10 \text{ m}^3$  par jour sur une durée d'une heure, correspondant à un épisode pluvieux de 14,8 mm), donc cet impact peut être considéré comme négligeable. En revanche, les EUD constituent un apport important en nutriments qui peut stimuler la croissance des palétuviers (Lovelock *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2008; Herteman *et al.*, 2011). Des espèces

ayant un fort besoin en nutriments peuvent ainsi se développer au dépens de celles qui sont plus adaptées à des environnements pauvres en nutriments (Feller *et al.*, 2010). Ceci peut conduire à une perturbation de l'écosystème car les espèces capables de se développer dans des environnements pauvres en nutriments assurent des fonctions écosystémiques importantes (Feller *et al.*, 2010). Dans notre étude, les EUD ont engendré une forte stimulation de la croissance des palétuviers. Cet effet, bien qu'il semble positif, est à nuancer, car cela s'est accompagné d'une augmentation de la mortalité des arbres de l'espèce *R. mucronata* à long terme. Ceci pourrait s'expliquer par la disponibilité en oxygène dans les sédiments diminuée par les rejets qui favorise des activités microbiennes causant de l'anoxie (Brzezinska *et al.*, 2006). Les palétuviers ont d'ailleurs développé des adaptations afin de pallier au manque d'oxygène (Visser *et al.*, 2000). De plus, la fermeture de canopée induite par les EUD limite l'arrivée de lumière pour les plus petits arbres, menaçant leur croissance. L'enrichissement en nutriments stimule la croissance des branches au détriment des racines, les rendant plus vulnérables à la force des vents et des vagues (Lovelock *et al.*, 2009). La présence de métaux lourds et de contaminants organiques tels que les pesticides dans les EUD pourrait également affecter la végétation de la mangrove (Lewis *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014). Il a ainsi été montré que les polluants contenus dans des effluents urbains et agricoles affectent fortement les fonctions écosystémiques et la stabilité des écosystèmes de mangrove (Lewis *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014) et causent d'importants dommages pour la végétation et la faune (Olguin *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2011).

Les crabes jouent un rôle essentiel dans l'écosystème mangrove en tant qu'espèces ingénieurs (Jones *et al.*, 1994; Lee, 1998). Leur habitat (terriers) et leur activité de bioturbation induisent des modifications physiques de leur environnement. Ils favorisent l'oxygénation et l'enrichissement des sédiments en matière organique, ainsi que la circulation de l'eau et de la matière organique. La distribution des crabes dans la mangrove est influencée par différents facteurs tels que l'humidité relative, la température, la porosité du sédiment et sa granulométrie, le gradient de salinité et les espèces de palétuviers (Steinke *et al.*, 1993; Frusher *et al.*, 1994). Les EUD peuvent affecter directement les crabes par le biais d'une diminution de la salinité grâce à l'apport d'eau douce. Or les crabes de la mangrove de Malamani ne sont pas distribués selon un gradient de salinité. Des espèces sensibles à la salinité ont été retrouvées dans le faciès de végétation où les conditions de salinité sont plus fortes, et des espèces halotolérantes sont plus nombreuses dans le faciès où la salinité est la plus faible. Dans notre cas, les effets des EUD sont alors essentiellement dus au contenu en nutriments des EUD. Contrairement au

modèle décrit par Pearson et Rosenberg (1978), l'enrichissement en nutriments n'a pas stimulé les abondances d'Ocypodidae mais celles des Sesamidae. Les espèces d'Ocypodidae tendent de plus en plus à migrer en dehors des parcelles impactées. Ces déplacements de population peuvent être liés à la présence de micropolluants dans les EUD qui peuvent avoir un effet délétère sur les crabes (Olguin *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2011; Banci *et al.*, 2017). Les crabes les plus habitués au stress naturel induit par exemple par les marées seraient plus aptes à supporter les stress induits par l'apport de pollutions organiques, donc les espèces plus résistantes devraient occuper le faciès *R. mucronata*. Dans notre étude, les crabes ont été montrés plus résistants à un impact à court-terme dans ce faciès de végétation mais fortement impactés à long-terme. De plus, les effets directs des EUD sur la végétation peuvent indirectement affecter les populations de crabes. En effet, les EUD vont entraîner des changements dans les conditions de luminosité et de température et modifier leur source de nourriture (diminuer les biofilms algaux, augmenter la litière de feuilles).

Tout comme les crabes, la méiofaune rassemble des espèces ingénieurs indispensables au fonctionnement de la mangrove (Jones *et al.*, 1994; Lee, 1998). Ces espèces sont fortement influencées par les changements dans leur environnement et par l'apport de polluants (Giere, 2009). Les nutriments présents dans les EUD peuvent modifier la structure et la densité des communautés (Gómez Noguera and Hendrickx, 1997; Zhou *et al.*, 2015) principalement par des effets indirects sur les conditions environnementales. La méiofaune peut être influencée par la granulométrie du sédiment, son oxygénation, la salinité et la quantité de matière organique particulaire (Nagelkerken *et al.*, 2008). Cette dernière est une ressource importante pour la méiofaune, tout comme le sont les bactéries et les micro-algues qui peuvent elles aussi être influencées par l'excès de nutriment et alors jouer sur la structure de la méiofaune. En effet, cette étude a révélé des changements dans la diversité des nématodes par des modifications des groupes trophiques et des morphotypes en lien avec des modifications de leur ressource en nourriture.

Les sédiments sont le siège des réactions biogéochimiques réalisées par les communautés microbiennes dont la nitrification, la dénitrification et la décomposition de la matière organique. Elles participent ainsi à la réalisation des cycles des nutriments. De plus, les sédiments stockent les éléments nutritifs nécessaires à la nutrition des espèces végétales et animales. Un apport de

nutriments par les EUD a conduit à une modification de la structure des communautés microbiennes et à une augmentation de leur densité et de leurs activités, en particulier celles des communautés impliquées dans l'élimination des nutriments. En présence des EUD, les microorganismes ne sont plus stressés par le manque de nutriments qui caractérise les mangroves, et sont alors plus diversifiés (Fernandes *et al.*, 2014). Les hétérotrophes vont être principalement influencés par l'excès de carbone, les phototrophes par le phosphore et par l'azote pour ceux qui interviennent dans ce cycle. Ensuite les EUD peuvent contenir des micropolluants tels que les antibiotiques et les pesticides qui pourraient affecter les communautés microbiennes. La structure et la composition microbienne sont également influencées indirectement par les EUD par des modifications de paramètres environnementaux abiotiques et biotiques (litière au sol, température, pH, disponibilité en nutriments, salinité) (Chakraborty *et al.*, 2015). De plus les communautés microbiennes peuvent être perturbées par un impact des EUD sur les crabes et leur activité de bioturbation. En effet, les crabes augmentent la surface d'échange du sédiment avec l'eau ou l'air et favorisent les activités de nitrification ou de dénitrification (Herteman, 2010).

Pour connaître la réponse globale de la mangrove face aux EUD, il faut prendre en compte tous les compartiments, leurs interactions et les impacts directs et indirects des EU (**Figure 25**). Un tel écosystème est en effet soumis à plusieurs stress simultanément. La mangrove présente la particularité d'être à l'interface entre les eaux douces et marines. Il est donc difficile de prédire avec certitude le type d'interaction qui aura lieu entre les différents stress auxquels elle est soumise. La grande diversité des écosystèmes d'eau douce leur permet de s'adapter plus facilement à un contexte de multi-stress que les écosystèmes marins (Jackson *et al.*, 2016). La plupart des études de multi-stress sur les écosystèmes d'eau douce ont ainsi mis en évidence des effets antagonistes (l'effet de deux stress combinés est moins important que la somme des effets de chaque stress individuel). La synergie (effet du multi-stress supérieur à la somme des effets de chaque stress individuellement) est quant à elle davantage présente pour les écosystèmes marins. Dans le contexte de notre étude, la mangrove est soumise à plusieurs stress, dont des stress naturellement présents, plus importants pour chaque faciès de végétation (salinité et aridité pour *C. tagal*, cycle des marées pour *R. mucronata*), et un stress additionnel (les eaux usées domestiques). Notre étude permet de mettre en évidence un nouvel exemple d'effet antagoniste. En effet, les effets observés en présence des eaux usées sont limités par le cycle des marées, ceci étant davantage marqué pour le faciès *R. mucronata*. Au multi-stress

s'ajoute également une influence spatiotemporelle de l'impact des EUD. La réponse de la mangrove peut être différente selon la saisonnalité (dilution de l'effet des EUD en saison des pluies) et le faciès de végétation.

Les précédents travaux de thèse de Mélanie Herteman (2010) ont mis en évidence les capacités épuratrices de la mangrove de Malamani choisie comme exutoire des EUD prétraitées. Ces travaux ont montré qu'un hectare de mangrove serait capable d'épurer efficacement l'apport azoté produit par jour (250 EqH), et en particulier dans le faciès *R. mucronata*. L'épuration des EUD est possible grâce à l'activité bactérienne, stimulée en présence des EUD, et à l'assimilation par les palétuviers, se traduisant par une augmentation de leur croissance. Les conclusions se sont alors portées sur une préférence pour le faciès *R. mucronata* pour la bio-épuration des EUD car celui-ci est moins réducteur, les sédiments sont plus fins, les surfaces d'échange sont plus grandes, et les densités de bactéries responsables de la nitrification et de la dénitrification y sont plus élevées. Cependant cette étude était basée sur des résultats à court-terme (moins de 18 mois), un dysfonctionnement de l'écosystème pourrait être induit à long-terme.

Mes travaux de thèse ont permis de déterminer les effets d'un apport à long-terme des EUD sur les différents compartiments de la mangrove, donc de déterminer leurs capacités de résistance à long-terme. De plus, cette étude a permis de déterminer la dynamique d'un impact à court terme sur les compartiments de la mangrove et de mettre en évidence des capacités de résilience de ces compartiments. L'impact à court et long-terme et la résilience ont été mesurés pour les compartiments de la végétation, de la faune (crabes et méiofaune) et des sédiments (communautés microbiennes) dans chaque faciès de végétation afin de déterminer le meilleur faciès pour l'accueil des EUD et déterminer la durée d'épandage. L'étude à long-terme des compartiments a montré le potentiel de résistance du faciès *C. tagal*. En revanche l'étude à court-terme a mis en évidence une résistance plus forte des compartiments dans le faciès *R. mucronata*. De plus, l'état d'équilibre des sédiments était plus rapidement atteint dans le faciès *R. mucronata*. Le faciès de végétation idéal devrait présenter un certain potentiel de résilience après l'arrêt de la perturbation.

De manière générale, la résilience des communautés après une perturbation dépend de leur résistance à des perturbations antérieures. Ces dernières contribuent à la sélection d'espèces résistantes et tolérantes qui reviendront plus rapidement à un état initial après l'arrêt de la perturbation. La stabilité des communautés est alors reliée aux propriétés de l'individu, de la population et de la communauté (Shade *et al.*, 2012). Elle dépend de la résistance des individus à la perturbation, de leur tolérance, de leur plasticité, de leur diversité et de leur potentiel d'immigration. Bien que la structure microbienne puisse être modifiée par un apport d'EUD, les microorganismes maintiennent la fonction microbienne dans les sédiments grâce à la redondance fonctionnelle. La résilience est ainsi associée à une récupération fonctionnelle (Song *et al.*, 2015). L'étude des capacités de résilience des compartiments a montré un potentiel de résilience plus important pour le faciès *R. mucronata* pour la végétation et les communautés microbiennes alors que les crabes reviennent plus rapidement à leur état initial dans le faciès *C. tagal*.

Aucun dysfonctionnement majeur de l'écosystème mangrove n'a été observé au niveau des compartiments. Une rupture fonctionnelle de la mangrove serait atteinte par la disparition des crabes ou l'arrêt de l'activité de bioturbation ou par la formation de trous au niveau de la canopée liée à la disparition de grande bande de végétation ou encore par la disparition de 50 % des palétuviers (Saenger, 2002).

Les résultats obtenus pour le choix du faciès de végétation sont contradictoires. Dans un système d'utilisation des parcelles de mangrove pendant de courtes périodes, le faciès *R. mucronata* serait plus intéressant pour une bio-épuration efficace des EUD sans dommage majeur sur les compartiments. Mais si le système est basé sur des rotations de parcelle à long-terme, le faciès *C. tagal* serait plus approprié pour réduire l'impact de l'excès d'eau douce et de nutriments sur les communautés de crabes. Or si ce faciès est sélectionné pour des périodes longues, le temps de résilience après une longue exposition aux EUD (6,5 ans) est plus long que pour le faciès *R. mucronata*. Cependant nous n'avons pas étudié la résilience des compartiments après l'arrêt d'une perturbation courte (2 ans). Sachant que les populations de crabes sont moins impactées à court-terme dans le faciès *R. mucronata*, elles pourraient être également plus résilientes à court-terme.

Par conséquent, dans le cadre de l'utilisation de la mangrove comme réceptacle terminal aux EUD, le choix final se porterait sur une rotation des parcelles de mangrove courte, tous les deux ans maximum avec un rejet d'EUD dans le faciès de végétation *R. mucronata*. Le seul point de

vigilance reste l'absence d'étude sur les capacités de résilience des compartiments après une perturbation courte.





### 3. Perspectives

Le changement global, dont l'Homme est en partie responsable, cause des perturbations importantes dans de nombreux écosystème à travers le monde. Les mangroves sont doublement impactées par ce changement global. D'une part, l'augmentation de la démographie autour des mangroves entraîne une sollicitation de plus en plus fréquente de ces dernières (déforestations, contamination par des polluants organiques). D'autre part, les dérèglements climatiques induisent des épisodes de plus en plus violents de tempêtes et d'ouragans (délétères pour la forêt de mangrove) et les hausses de température induisent une hausse globale du niveau des océans et affecte ainsi les mangroves le long des côtes. Depuis la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, une élévation de 12 à 22 cm a été mesurée (Spalding *et al.*, 2010). Les estimations prévoient une élévation de 90 à 130 cm supplémentaires d'ici la fin du 21<sup>ème</sup> siècle. Un à 2 % des mangroves disparaissent chaque année (Duke *et al.*, 2007). La perte des mangroves entraînerait des pertes de services écosystémiques fournis aux communautés marines et aux sociétés humaines. Les estimations indiquent que 100 % des mangroves disparaîtront d'ici les 100 prochaines années si les expositions anthropiques et climatiques ne changent pas (Duke *et al.*, 2007).

Les perspectives qui découlent de mes travaux de thèse peuvent se caractériser : (i) “à court terme” dans la continuité directe de notre étude et qui serviront à compléter les résultats obtenus durant ma thèse et (ii) des perspectives à plus long-terme et plus globales (étendues à d'autres sites d'étude et d'autres types de prétraitements d'eaux usées). L'ensemble de ces perspectives doit permettre d'apporter des éléments de réflexion pour de futures études afin d'améliorer la connaissance sur la gestion des eaux usées domestiques prétraitées et leurs éventuels impacts sur la biodiversité dans les milieux insulaires soumis à de fortes pressions anthropiques.

#### 3.1. Perspectives à court terme pour le site d'étude de Mayotte

Cette thèse a mis en évidence une forte croissance des palétuviers *C. tagal* et *R. mucronata*, plus rapide pour les *C. tagal*. Mais les *R. mucronata* ont été marqués par une mortalité des individus après une exposition de 6,5 années. L'état de stress en nutriments des mangroves pourrait causer un délai de réponse des palétuviers et conduire ensuite à une augmentation de la mortalité chez les *R. mucronata* et une apparition de la mortalité chez les *C. tagal*. Sachant

que les arbres n'évoluent pas aussi rapidement que d'autres organismes, il serait intéressant de réaliser une nouvelle campagne d'évaluation de la structure de la végétation d'ici quatre ans pour voir le taux de croissance et de mortalité des deux espèces de palétuviers après une exposition aux EUD de 14,5 ans.

D'un point de vue biochimique, des analyses supplémentaires sur les pigments de feuilles permettraient de comparer le contenu pigmentaire de feuilles en bonne santé à des feuilles sénescentes et de comparer le taux de dégradation des pigments. De plus cette information nous permettrait de voir la part des pigments de feuilles dans les sédiments de mangrove et déterminer si nos quantifications d'organismes phototrophes dans les sédiments par la quantification de pigments ont été surestimées.

Des mesures *in situ* des paramètres physicochimiques des sédiments pourraient être réalisées pour déterminer les profils de pH, d'oxygène, d'ammonium et de potentiel redox dans les 20 premiers centimètres des sédiments pour déterminer dans quelles profondeurs de sédiments exactes sont effectuées les processus du cycle de l'azote (nitrification, dénitrification) dans des parcelles de mangroves exposées aux EUD. Ces données pourraient être associées à des prélèvements de sédiments pour déterminer les populations microbiennes actives par la quantification par RT-qPCR du transcrit des différents gènes du cycle de l'azote. Les quantifications de densités microbiennes par Q-PCR nous donne seulement une information sur la présence de bactéries ciblées mais ne nous informe pas si elles sont actives dans les processus microbiens. De plus il serait intéressant de déterminer la structure des communautés microbiennes par méta-génomique aux différents stades des parcelles : sans perturbation, après une perturbation à court ou long-terme et après l'arrêt de cette perturbation.

Concernant la faune benthique des mangroves, nos résultats ont montré une absence de résilience des crabes dans le faciès de végétation *R. mucronata* après l'arrêt d'une perturbation de 7,5 années. Pourtant les crabes se sont montrés plus résistants aux EUD dans le faciès *R. mucronata*. Ce faciès étant associé à une exposition plus marquée aux marées, l'impact des EUD plus tamponné apporte une tolérance plus importante des communautés. Nous pourrions nous attendre à un potentiel de résilience aussi fort après l'arrêt d'une perturbation à court-terme. Il serait intéressant d'arrêter les rejets et déterminer si les capacités du faciès *R. mucronata* sont similaires après l'arrêt des EUD dans les parcelles exposées à court ou long terme.

L'impact des EUD sur les crabes s'est traduit par une baisse de la diversité en lien avec une migration hypothétique des crabes hors des parcelles impactées. Une étude plus poussée sur ce phénomène pourrait être réalisée pour comprendre la réponse des crabes aux EUD. Des études écotoxicologiques sont actuellement réalisées par le Centre Universitaire de Mayotte sur la mangrove de Malamani pour déterminer l'effet des EUD sur la physiologie des crabes et déterminer si la diminution des Ocypodidae est liée à la migration ou à la mortalité des crabes. Des comptages de crabes dans des parcelles de mangroves non exposées ou exposées aux EUD, hors des parcelles d'étude, pourraient être mis en place pour comparer les proportions de Sesamididae et d'Ocypodidae dans d'autres zones de mangrove. Nous pourrions nous demander si l'espacement des parcelles témoins et impactées (15 m) est suffisant pour ne pas impacter la population de crabe en dehors de la zone de rejet. De plus, un système de géolocalisation des crabes, par puces GPS fixées sur les crabes, pourrait nous apporter des informations sur le comportement des crabes en présence des EUD (migration, mortalité, surface de déplacement, arrêt de la bioturbation).

### 3.2. Perspectives sociétales et environnementales

Cette étude a permis de montrer les différences de sensibilité aux EUD des différents compartiments de la mangrove. Nous avons pu déterminer le faciès de végétation « idéal » pour réceptionner les rejets d'EUD prétraités, ainsi que la fréquence de rotation des parcelles. Cependant ces résultats sont spécifiques aux parcelles d'étude dans la mangrove à Malamani. Il serait donc intéressant de développer à l'avenir un indicateur biologique fonctionnel pour évaluer l'état de l'écosystème mangrove soumis à des EUD. Cet indicateur devra être testé sur d'autres mangroves de Mayotte et à travers le monde pour être validé. La méiofaune pourrait être utilisée comme bio-indicateur car les espèces qui la composent sont fortement sensibles aux perturbations environnementales. Leur temps de génération court leur permet de réagir rapidement aux changements environnementaux (salinité, marée haute, concentration en oxygène, contenu organique et granulométrie des sédiments). Ces variations conduisent à des modifications d'abondance, de distribution spatiale et de composition de ces communautés. La méiofaune est d'ailleurs privilégiée comme bio-indicateur dans le suivi des environnements marins (Moreno *et al.*, 2011). Les micro-algues pourraient également servir de bio-indicateur. En raison de leur localisation à la surface des sédiments, ces microorganismes

photosynthétiques sont plus affectés que les bactéries dans les sédiments. Les micro-algues pourraient ainsi constituer des indicateurs plus fiables et plus sensibles pour détecter une évolution trophique du milieu (potentielle bio-indication). Parmi les micro-algues, les diatomées sont connues pour jouer un rôle central dans les réseaux trophiques côtiers et elles sont souvent utilisées pour indiquer le statut trophique des rivières (Berthon *et al.*, 2011). Les diatomées peuvent ainsi servir de sentinelle, témoin des changements de l'environnement dans l'écosystème mangrove (Bouchez *et al.*, 2013).

L'utilisation des mangroves comme exutoire suite à un traitement primaire des eaux usées ne pourra être validée qu'après s'être assuré que l'on ne contamine pas l'environnement avec des micropolluants, des bactéries pathogènes et des gènes de résistance aux antibiotiques. En effet, les effluents en sortie du système de traitement primaire présentent une charge bactériologique élevée. Parmi ces bactéries, il conviendra de s'assurer que les EUD ne sont pas vectrices de bactéries pathogènes comme cela est fait lors de la surveillance de rejet dans des zones de baignade (lacs, rivières, littoral marin ou océanique). En effet, dans ces zones la présence de germes (*Escherichia coli* et entérocoques intestinaux), témoins de contamination fécale, est déterminée. Les EUD peuvent également constituer une source de micropolluants tels que des pesticides et des antibiotiques. Ces molécules pouvant influencer les communautés microbiennes, il faudrait en déterminer l'impact pour les microorganismes dans le cas d'une exposition chronique. Enfin, il sera nécessaire de déterminer si les eaux usées ne favorisent pas la dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement. En effet, il a déjà été montré que des antibiotiques de la famille des fluoroquinolones peuvent s'accumuler dans les sédiments de mangrove (Cabral *et al.*, 2016). Leur présence favorise le développement de microorganismes porteurs de gènes de résistance qui sont présents naturellement dans ce type d'environnement. Ces gènes de résistance seraient ainsi détournés de leur fonction naturelle (résistance aux toxines et autres molécules antimicrobiennes naturelles présentes dans l'eau de mer) pour conférer un avantage aux microorganismes qui les possèdent lors d'exposition aux antibiotiques présents dans les eaux usées.

L'efficacité du traitement des eaux usées prétraitées par la mangrove doit être déterminée avec précision afin d'éviter tout impact sur le lagon. La fréquence des rejets, leur localisation et les quantités d'eaux usées déversées devront être calculées et ajustées pour chaque type de

mangrove. En effet, les conditions optimales pour un bon fonctionnement de ce système d'épuration dépendent des conditions environnementales spécifiques à chaque mangrove (*e.g* saisonnalité, salinité, insulaire ou continentale, etc.). Un protocole strict de suivi de la qualité des eaux et de l'état de l'écosystème du lagon devra être mis en place, notamment par l'installation de piézomètres en bordure du lagon et en aval des zones de rejets d'eaux usées dans la mangrove pour mesurer l'abattement des nutriments provenant des eaux usées et statuer sur une bio-épuration efficace par la mangrove sans risque pour la biodiversité du lagon. La gestion du milieu permettra donc de garantir la stabilité des écosystèmes marins au contact direct ou indirect avec les effluents d'eaux usées.

Finalement, il conviendra de définir, à destination des gestionnaires de l'assainissement et du patrimoine naturel du littoral, un guide méthodologique leur permettant de décliner les conditions de mobilisation de la mangrove en tant qu'exutoire d'EUD prétraitées (faciès de végétation, surface d'épandage, rotations précisant les durées d'apport et de repos, etc.) et les conditions d'auto-surveillance (nature des paramètres à suivre et fréquence des analyses) de la mangrove permettant de garantir le maintien des services écosystémiques.



## **Références Bibliographiques**





- Abdallah, K. and Eymard, S. (2012) Atlas des mangroves de Mayotte. *Deal. Biodiversité* 102.
- Aburto-Oropeza, O., Ezcurra, E., Danemann, G., Valdez, V., Murray, J., and Sala, E. (2008) Mangroves in the Gulf of California increase fishery yields. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 10456–10459.
- Agraz Hernandez, C.M., Garcia Zaragoza, C., Iriarte-Vivar, S., Flores-Verdugo, F.J., and Moreno Casasola, P. (2011) Forest structure, productivity and species phenology of mangroves in the La Mancha lagoon in the Atlantic coast of Mexico. *Wetl. Ecol. Manag.* **19**: 273–293.
- Allen, J. (1998) Mangroves as alien species: the case of Hawaii. *Glob. Ecol. Biogeogr. Lett.* **7**: 61–71.
- Alongi, D. m., Boto, K. g., and Robertson, A. i. (1992) Nitrogen and Phosphorus Cycles. In, Robertson, A.I. and Alongi, D.M. (eds), *Tropical Mangrove Ecosystems*. American Geophysical Union, pp. 251–292.
- Alongi, D.M. (2012) Carbon sequestration in mangrove forests. *Carbon Manag.* **3**: 313–322.
- Alongi, D.M. (2008) Mangrove forests: Resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate change. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **76**: 1–13.
- Alongi, D.M. (2009a) Paradigm shifts in mangrove biology. *Coast. Wetl. Integr. Ecosyst. Approach Elsevier Amst. Países Bajos* P 615–640.
- Alongi, D.M. (2002) Present state and future of the world's mangrove forests. *Environ. Conserv.* **29**: 331–349.
- Alongi, D.M. (2009b) The energetics of mangrove forests Springer. Springer Science & Business Media, Australia.
- Alvarenga, D.O., Rigonato, J., Branco, L.H.Z., and Fiore, M.F. (2015) Cyanobacteria in mangrove ecosystems. *Biodivers. Conserv.* **24**: 799–817.
- Andreetta, A., Fusi, M., Cameldi, I., Cimò, F., Carnicelli, S., and Cannicci, S. (2014) Mangrove carbon sink. Do burrowing crabs contribute to sediment carbon storage? Evidence from a Kenyan mangrove system. *J. Sea Res.* **85**: 524–533.
- Angelici, F.M., Politano, E., Bogudue, A.J., and Luiselli, L. (2005) Distribution and habitat of otters (*Aonyx capensis* and *Lutra maculicollis*) in southern Nigeria. *Ital. J. Zool.* **72**: 223–227.
- Arfi, Y. (2012) Application des techniques de séquençage “nouvelle génération” à l’exploration de la diversité fongique en mangrove et à l’étude des mécanismes d’interaction entre champignons.
- Arrivabene, H.P., Souza, I. da C., Có, W.L.O., Conti, M.M., Wunderlin, D.A., and Milanez, C.R.D. (2015) Effect of pollution by particulate iron on the morphoanatomy, histochemistry, and bioaccumulation of three mangrove plant species in Brazil. *Chemosphere* **127**: 27–34.
- Ashton, E.C. (1999) Biodiversity and community ecology of mangrove plants: molluscs and crustaceans in two mangrove forests in Peninsular Malaysia in relation to local management practices.
- Austin, M. (1985) Continuum Concept, Ordination Methods, and Niche Theory. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **16**: 39–61.
- Ball, M. (1998) Mangrove species richness in relation to salinity and waterlogging: a case study along the Adelaide River floodplain, Northern Australia. *Glob. Ecol. Biogeogr. Lett.* **7**: 73–82.
- Ball, M.C. (2002) Interactive effects of salinity and irradiance on growth: implications for mangrove forest structure along salinity gradients. *Trees* **16**: 126–139.

- Ball, P. (2002) Natural strategies for the molecular engineer. *Nanotechnology* **13**: R15.
- Banci, K.R. da S., Mori, G.M., Oliveira, M.A., Pganelli, F.L., Pereira, M.R., and Pinheiro, M.A.A. (2017) Can environmental pollution by metals change genetic diversity? *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) as a study case in Southeastern Brazilian mangroves. *Mar. Pollut. Bull.* **Article in press**:
- Barrett, M.A. and Stiling, P. (2006) Effects of Key deer herbivory on forest communities in the lower Florida Keys. *Biol. Conserv.* **129**: 100–108.
- Bartolini, F., Cimò, F., Fusi, M., Dahdouh-Guebas, F., Lopes, G.P., and Cannicci, S. (2011) The effect of sewage discharge on the ecosystem engineering activities of two East African fiddler crab species: Consequences for mangrove ecosystem functioning. *Mar. Environ. Res.* **71**: 53–61.
- Bartolini, F., Penha-Lopes, G., Limbu, S., Paula, J., and Cannicci, S. (2009) Behavioural responses of the mangrove fiddler crabs (*Uca annulipes* and *U. inversa*) to urban sewage loadings: Results of a mesocosm approach. *Mar. Pollut. Bull.* **58**: 1860–1867.
- Berland, J.-M., Boutin, C., Cooper, P., and Molle, P. (2001) Procédés extensifs d'épuration des eaux usées adaptés aux petites et moyennes collectivités. *Comm. Eur. - Brux.* **44**.
- Berthon, V., Bouchez, A., and Rimet, F. (2011) Using diatom life-forms and ecological guilds to assess organic pollution and trophic level in rivers: a case study of rivers in south-eastern France. *Hydrobiologia* **673**: 259–271.
- Bertrand, J.C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., and Normand, P. (2011) Ecologie microbienne: Microbiologie des milieux naturels et anthropisés. *Press. Univ. Pau Pays Adour*.
- Blasco, F. (1991) LES MANGROVES. *La Recherche* **444**–453.
- Boonsong, K., Piyatiratitivorakul, S., and Patanaponpaiboon, P. (2003) Potential use of mangrove plantation as constructed wetland for municipal wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* **48**: 257–266.
- Bordignon, M.O. (2006) Diet of the fishing bat *Noctilio leporinus* (Linnaeus) (Mammalia, Chiroptera) in a mangrove area of southern Brazil. *Rev. Bras. Zool.* **23**: 256–260.
- Boto, K.G. and Wellington, J.T. (1984) Soil characteristics and nutrient status in a Northern Australian mangrove forest. *Estuaries* **7**: 61–69.
- Botto, F., Iribarne, O., Gutierrez, J., Bava, J., Gagliardini, A., and Valiela, I. (2006) Ecological importance of passive deposition of organic matter into burrows of the SW Atlantic crab *Chasmagnathus granulatus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **312**: 201–210.
- Bouchard, J.-M., Poupin, J., Cleve, R., Dumas, J., and Dinhut, V. (2013) Land, mangrove and freshwater decapod crustaceans of Mayotte region (Crustacea, Decapoda). *Atoll Res. Bull.* **592**: 1–60.
- Bouchez, A., Pascual, N., Chardon, C., Bouvy, M., Cecchi, P., Lambs, L., et al. (2013) Mangrove microbial diversity and the impact of trophic contamination. *Mar. Pollut. Bull.* **66**: 39–46.
- Bouillon, S., Borges, A.V., Castaneda-Moya, E., Diele, K., Dittmar, T., Duke, N.C., et al. (2008) Mangrove production and carbon sinks: A revision of global budget estimates. *Glob. Biogeochem. Cycles* **22**: GB2013.
- Boutin, C. and Eme, C. (2016) Domestic Wastewater Characterization by Emission Source. In, *13eme congres spécialisé IWA on Small Water and wastewater Systems.*, pp. 8–p.
- Brzezinska, M., Tiwari, S.C., Stepniewska, Z., Nosalewicz, M., Bennicelli, R.P., and Samborska, A. (2006) Variation of enzyme activities, CO<sub>2</sub> evolution and redox potential in an Eutric Histosol irrigated with wastewater and tap water. *Biol. Fertil. Soils* **43**: 131–135.
- Cabral, L., Júnior, G.V.L., Pereira de Sousa, S.T., Dias, A.C.F., Lira Cadete, L., Andreote, F.D., et al. (2016) Anthropogenic impact on mangrove sediments triggers differential

- responses in the heavy metals and antibiotic resistomes of microbial communities. *Environ. Pollut.* **216**: 460–469.
- Camilleri, J.C. (1992) Leaf-litter processing by invertebrates in a mangrove forest in Queensland. *Mar. Biol.* **114**: 139–145.
- Cannicci, S., Bartolini, F., Dahdouh-Guebas, F., Fratini, S., Litulo, C., Macia, A., et al. (2009) Effects of urban wastewater on crab and mollusc assemblages in equatorial and subtropical mangroves of East Africa. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **84**: 305–317.
- Cannicci, S., Burrows, D., Fratini, S., Smith III, T.J., Offenberg, J., and Dahdouh-Guebas, F. (2008) Faunal impact on vegetation structure and ecosystem function in mangrove forests: A review. *Aquat. Bot.* **89**: 186–200.
- Chakraborty, A., Bera, A., Mukherjee, A., Basak, P., Khan, I., Mondal, A., et al. (2015) Changing bacterial profile of Sundarbans, the world heritage mangrove: Impact of anthropogenic interventions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 593–610.
- Chinnadurai, G. and Fernando, O.J. (2007) Meiofauna of mangroves of the southeast coast of India with special reference to the free-living marine nematode assemblage. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **72**: 329–336.
- Christensen, B. (1982) Management and utilization of mangroves in Asia and the Pacific.
- Clough, B.F., Boto, K.G., and Attiwill, P.M. (1983) Mangroves and sewage: a re-evaluation. In: Teas, H.J. (ed), *Biology and ecology of mangroves*, Tasks for vegetation science. Springer Netherlands, pp. 151–161.
- Corredor, J. and Morell, J. (1994) Nitrate Depuration of Secondary Sewage Effluents in Mangrove Sediments. *Estuaries* **17**: 295–300.
- Cribb, A.B. and Cribb, J.W. (1955) Marine fungi from Queensland-II. *Pap. U Qld. Bot Dept* **3**: 78–81.
- Cuarón, A.D., Martínez-Morales, M.A., Mcfadden, K.W., Valenzuela, D., and Gompfer, M.E. (2004) The status of dwarf carnivores on Cozumel Island, Mexico. *Biodivers. Conserv.* **13**: 317–331.
- Dahdouh-Guebas, F., Giuggioli, M., Oluoch, A., Vannini, M., and Cannicci, S. (1999) Feeding habits of non-ocypodid crabs from two mangrove forests in Kenya. *Bull. Mar. Sci.* **64**: 291–297.
- Dahdouh-Guebas, F., Verneirt, M., Tack, J.F., and Koedam, N. (1997) Food preferences of *Neosarmatium meinerti* de Man (Decapoda: Sesarminae) and its possible effect on the regeneration of mangroves. *Hydrobiologia* **347**: 83–89.
- Dahdouh-Guebas, F., Vrancken, D., Ravishankar, T., and Koedam, N. (2006) Short-term mangrove browsing by feral water buffalo: conflict between natural resources, wildlife and subsistence interests? *Environ. Conserv.* **33**: 157–163.
- Davie, P.J., Guinot, D., and Ng, P.K. (2015) Systematics and classification of Brachyura. *Treatise Zool. Taxon. Biol. Crustac.* **9**: 1049–130.
- Day, J.W., Christian, R.R., Boesch, D.M., Yanez-Arancibia, A., Morris, J., Twilley, R.R., et al. (2008) Consequences of climate change on the ecogeomorphology of coastal wetlands. *Estuaries Coasts* **31**: 477–491.
- Decho, A.W. (2000) Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Cont. Shelf Res.* **20**: 1257–1273.
- Delabie, J.H.C., Paim, V.R.L. de M., do Nascimento, I.C., Campiolo, S., and Mariano, C. dos S.F. (2006) Ants as biological indicators of human impact in mangroves of the Southeastern Coast of Bahia, Brazil. *Neotrop. Entomol.* **35**: 602–615.

- Della Patrona, L., Marchand, C., Hubas, C., Molnar, N., Deborde, J., and Meziane, T. (2016) Meiofauna distribution in a mangrove forest exposed to shrimp farm effluents (New Caledonia). *Mar. Environ. Res.* **119**: 100–113.
- Dias, A.C.F., Silva, M. de C.P. e, Cotta, S.R., Dini-Andreote, F., Soares, F.L., Salles, J.F., et al. (2012) Abundance and Genetic Diversity of nifH Gene Sequences in Anthropogenically Affected Brazilian Mangrove Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 7960–7967.
- DINHUT, V., NICET, J.-B., and QUOD, J.-P. (2008) Suivi et état de santé 2007 des récifs coralliens de Mayotte. *Rev. Décologie* **63**:.
- Dittmar, T., Hertkorn, N., Kattner, G., and Lara, R.J. (2006) Mangroves, a major source of dissolved organic carbon to the oceans. *Glob. Biogeochem. Cycles* **20**: GB1012.
- Donato, D.C., Kauffman, J.B., Murdiyarso, D., Kurnianto, S., Stidham, M., and Kanninen, M. (2011) Mangroves among the most carbon-rich forests in the tropics. *Nat. Geosci.* **4**: 293–297.
- Drew, M.C. (1997) Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 223–250.
- Du, Y., Gao, S., Warwick, R.M., and Hua, E. (2014) Ecological functioning of free-living marine nematodes in coastal wetlands: an overview. *Chin. Sci. Bull.* **59**: 4692–4704.
- Duke, N. (2006) Mangrove taxonomy, biogeography and evolution - an Indo West Pacific perspective of implications for conservation and management. *Int. Conf. Exhib. Mangroves Indian West. Pac. Oceans ICEMAN Ed. Tan Kim Hooi Ong Jin Eong Jurgenne H Primav.* 84–99.
- Duke, N., Ball, M., and Ellison, J. (1998a) Factors influencing biodiversity and distributional gradients in mangroves. *Glob. Ecol. Biogeogr. Lett.* **7**: 27–47.
- Duke, N.C. (2016) Oil spill impacts on mangroves: Recommendations for operational planning and action based on a global review. *Mar. Pollut. Bull.* **109**: 700–715.
- Duke, N.C., Benzie, J.A.H., Goodall, J.A., and Ballment, E.R. (1998b) Genetic Structure and Evolution of Species in the Mangrove Genus *Avicennia* (avicenniaceae) in the Indo-West Pacific. *Evolution* **52**: 1612–1626.
- Duke, N.C., Meynecke, J.-O., Dittmann, S., Ellison, A.M., Anger, K., Berger, U., et al. (2007) A World Without Mangroves? *Science* **317**: 41–42.
- Duncan, M. (2003) Domestic wastewater treatment in developing countries. Duncan Mara. UK Cromwell Press, Trowbridge, UK.
- Dye, A.H. (2006) Persistent effects of physical disturbance on meiobenthos in mangrove sediments. *Mar. Environ. Res.* **62**: 341–355.
- Dyer, S.D., Peng, C., McAvoy, D.C., Fendinger, N.J., Masscheleyn, P., Castillo, L.V., and Lim, J.M.U. (2003) The influence of untreated wastewater to aquatic communities in the Balatun River, The Philippines. *Chemosphere* **52**: 43–53.
- Echezuria, H., Cordova, J., Gonzalez, M., Gonzalez, V., Mendez, J., and Yanes, C. (2002) Assessment of environmental changes in the Orinoco River delta. *Reg. Environ. Change* **3**: 20–35.
- EFSA (2011) L'EFSA fournit des informations actualisées sur les virus d'origine alimentaire.
- Eme, C. and Boutin, C. (2015) Composition des eaux usées domestiques par source d'émission à l'échelle de l'habitation. Etude bibliographique. ONEMA.
- Eriksson, E., Donner, E., and Ledin, A. (2010) Presence of selected priority and personal care substances in an onsite bathroom greywater treatment facility. *Water Sci. Technol.* **62**: 2889–2898.
- Ewel, K., Twilley, R., and Ong, J. (1998) Different kinds of mangrove forests provide different goods and services. *Glob. Ecol. Biogeogr. Lett.* **7**: 83–94.
- FAO (2007) The world's mangroves 1980-2005. *FAO For. Pap.* 1–89.

- Feller, I.C., Lovelock, C.E., Berger, U., McKee, K.L., Joye, S.B., and Ball, M.C. (2010) Biocomplexity in mangrove ecosystems. *Annu. Review Mar. Sci.* **2**: 395–417.
- Fernandes, M.E.B., Andrade, F.A.G., Júnior, S., and E, J. de S. (2006) Diet of *Micoreus demerarae* (Thomas) (Mammalia, Didelphidae) associated with contiguous forests of mangrove and terra firme in Bragança, Pará, Brazil. *Rev. Bras. Zool.* **23**: 1087–1092.
- Fernandes, S.O., Kirchman, D.L., Michotey, V.D., Bonin, P.C., and LokaBharathi, P.A. (2014) Bacterial diversity in relatively pristine and anthropogenically-influenced mangrove ecosystems (Goa, India). *Braz. J. Microbiol.* **45**: 1161–1171.
- Fernandes, S.O., Michotey, V.D., Guasco, S., Bonin, P.C., and Loka Bharathi, P.A. (2012) Denitrification prevails over anammox in tropical mangrove sediments (Goa, India). *Mar. Environ. Res.* **74**: 9–19.
- Flowers, T.J. and Colmer, T.D. (2008) Salinity tolerance in halophytes\*. *New Phytol.* **179**: 945–963.
- Fromard, F., Hoassaert Mckey, M., and Michaud, E. (2018) Mangrove, une forêt dans la mer Cherche Midi.
- Frusher, S.D., Giddins, R.L., and Smith, T.J. (1994) Distribution and abundance of grapsid crabs (Grapsidae) in a mangrove estuary: effects of sediment characteristics, salinity tolerances, and osmoregulatory ability. *Estuaries Coasts* **17**: 647–654.
- Fusi, M., Beone, G.M., Suci, N.A., Sacchi, A., Trevisan, M., Capri, E., et al. (2016) Ecological status and sources of anthropogenic contaminants in mangroves of the Wouri River Estuary (Cameroon). *Mar. Pollut. Bull.* **109**: 723–733.
- Ganguly, D., Dey, M., Sen, S., and Jana, T.K. (2009) Biosphere-atmosphere exchange of NO<sub>x</sub> in the tropical mangrove forest. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* **114**: G04014.
- Gibbs, J. and Greenway, H. (2003) Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Funct. Plant Biol.* **30**: 1–47.
- Giere, O. (2009) Meiobenthology: the microscopic motile fauna of aquatic sediments Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Springer Science & Business Media.
- Gilbert, G.S., Mejía-Chang, M., and Rojas, E. (2002) Fungal diversity and plant disease in mangrove forests: salt excretion as a possible defense mechanism. *Oecologia* **132**: 278–285.
- Gillikin, D.P. and Schubart, C.D. (2004) Ecology and systematics of mangrove crabs of the genus *Perisesarma* (Crustacea: Brachyura: Sesamidae) from East Africa. *Zool. J. Linn. Soc.* **141**: 435–445.
- Gilman, E.L., Ellison, J., Duke, N.C., and Field, C. (2008) Threats to mangroves from climate change and adaptation options: A review. *Aquat. Bot.* **89**: 237–250.
- Giri, C., Ochieng, E., Tieszen, L.L., Zhu, Z., Singh, A., Loveland, T., et al. (2011) Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. *Glob. Ecol. Biogeogr.* **20**: 154–159.
- Gomes, M.A. da C., Hauser-Davis, R.A., de Souza, A.N., and Vitória, A.P. (2016) Metal phytoremediation: General strategies, genetically modified plants and applications in metal nanoparticle contamination. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **134**: 133–147.
- Gomes, N.C.M., Cleary, D.F.R., Pinto, F.N., Egas, C., Almeida, A., Cunha, A., et al. (2010) Taking Root: Enduring Effect of Rhizosphere Bacterial Colonization in Mangroves. *PLOS ONE* **5**: e14065.
- Gómez Noguera, S.E. and Hendrickx, M.E. (1997) Distribution and abundance of meiofauna in a Subtropical Coastal Lagoon in the south-eastern Gulf of California, Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* **34**: 582–587.

- Gopal, B. and Chauhan, M. (2006) Biodiversity and its conservation in the Sundarban Mangrove Ecosystem. *Aquat. Sci.-Res. Boundaries* **68**: 338–354.
- Gutiérrez, J.L., Jones, C.G., Groffman, P.M., Findlay, S.E.G., Iribarne, O.O., Ribeiro, P.D., and Bruschetti, C.M. (2006) The contribution of crab burrow excavation to carbon availability in surficial salt-marsh sediments. *Ecosystems* **9**: 647–658.
- Hamilton, S.E. and Casey, D. (2016) Creation of a high spatio-temporal resolution global database of continuous mangrove forest cover for the 21st century (CGMFC-21). *Glob. Ecol. Biogeogr.* **25**: 729–738.
- Harris, J. (2009) Soil Microbial Communities and Restoration Ecology: Facilitators or Followers? *Science* **325**: 573–574.
- He, B., Lai, T., Fan, H., Wang, W., and Zheng, H. (2007) Comparison of flooding-tolerance in four mangrove species in a diurnal tidal zone in the Beibu Gulf. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **74**: 254–262.
- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., and Philippot, L. (2006) Quantitative Detection of the nosZ Gene, Encoding Nitrous Oxide Reductase, and Comparison of the Abundances of 16S rRNA, narG, nirK, and nosZ Genes in Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 5181–5189.
- Henze, M., Harremoës, P., Jansen, J. la C., and Arvin, E. (2001) Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes Springer Science & Business Media.
- Herteman, M. (2010) Evaluation des capacités bioremédiatrices d’une mangrove impactée par des eaux usées domestiques. Application au site pilote de Malamani, Mayotte. *PHD Toulouse Université Paul Sabatier*:
- Herteman, M., Fromard, F., and Lambs, L. (2011) Effects of pretreated domestic wastewater supplies on leaf pigment content, photosynthesis rate and growth of mangrove trees: A field study from Mayotte Island, SW Indian Ocean. *Ecol. Eng.* **37**: 1283–1291.
- Hoekstra, J., Molnar, J.L., Jennings, M., Revenga, C., Spalding, M.D., Boucher, T.M., et al. (2010) The atlas of global conservation: changes, challenges, and opportunities to make a difference. University of California press. Jennifer L. Molnar, Berkeley.
- Höflich, G., Wiehe, W., and Kühn, G. (1994) Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. *Experientia* **50**: 897–905.
- Hogarth, P.J. (2015) The biology of mangroves and seagrasses - Third Edition Oxford University Press.
- Holguin, G., Gonzalez-Zamorano, P., de-Bashan, L.E., Mendoza, R., Amador, E., and Bashan, Y. (2006) Mangrove health in an arid environment encroached by urban development—a case study. *Sci. Total Environ.* **363**: 260–274.
- Holguin, G., Vazquez, P., and Bashan, Y. (2001) The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biol. Fertil. Soils* **33**: 265–278.
- Huxham, M., Kumara, M.P., Jayatissa, L.P., Krauss, K.W., Kairo, J., Langat, J., et al. (2010) Intra- and interspecific facilitation in mangroves may increase resilience to climate change threats. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **365**: 2127–2135.
- Hyde, K.D. and Lee, S.Y. (1995) Ecology of mangrove fungi and their role in nutrient cycling: what gaps occur in our knowledge? *Hydrobiologia* **295**: 107–118.
- INSEE (2017) Recensement de la population à Mayotte. *256 500 Habitants À Mayotte En 2017 - Insee Focus - 105*.
- IRSTEA Institut national de recherche en sciences et technologies pour l’environnement et l’agriculture.
- Jackson, M.C., Loewen, C.J.G., Vinebrooke, R.D., and Chimimba, C.T. (2016) Net effects of multiple stressors in freshwater ecosystems: a meta-analysis. *Glob. Change Biol.* **22**: 180–189.

- Jeanson, M. (2009) The Coastal Morphodynamics of Mayotte Island, Indian Ocean: From Processes to A GIS-based Monitoring Network.
- Jennerjahn, T.C. and Ittekkot, V. (2002) Relevance of mangroves for the production and deposition of organic matter along tropical continental margins. *Naturwissenschaften* **89**: 23–30.
- Jones, C.G., Lawton, J.H., and Shachak, M. (1994) Organisms as ecosystem engineers. In, *Ecosystem management*. Springer, pp. 130–147.
- Jones, C.G., Lawton, J.H., and Shachak, M. (1997) Positive and Negative Effects of Organisms as Physical Ecosystem Engineers. *Ecology* **78**: 1946–1957.
- Kelleway, J.J., Cavanaugh, K., Rogers, K., Feller, I.C., Ens, E., Doughty, C., and Saintilan, N. (2017) Review of the ecosystem service implications of mangrove encroachment into salt marshes. *Glob. Change Biol.* **23**: 3967–3983.
- Kim, J.H., Gibb, H.J., and Howe, P.D. (2006) Cobalt and inorganic cobalt compounds: concise international assessment document. *World Health Organ. Rep.*
- Knowles, R. (1996) Denitrification: microbiology and ecology. *Life Support Biosphere Sci.* **3**: 31–34.
- Komiyama, A., Havanond, S., Srisawatt, W., Mochida, Y., Fujimoto, K., Ohnishi, T., et al. (2000) Top/root biomass ratio of a secondary mangrove (*Ceriops tagal* (Perr.) C.B. Rob.) forest. *For. Ecol. Manag.* **139**: 127–134.
- Komiyama, A., Ong, J.E., and Pongparn, S. (2008) Allometry, biomass, and productivity of mangrove forests: A review. *Aquat. Bot.* **89**: 128–137.
- Krauss, K.W., Allen, J.A., and Cahoon, D.R. (2003) Differential rates of vertical accretion and elevation change among aerial root types in Micronesian mangrove forests. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **56**: 251–259.
- Kristensen, E. (2008) Mangrove crabs as ecosystem engineers; with emphasis on sediment processes. *J. Sea Res.* **59**: 30–43.
- Kristensen, E. and Alongi, D.M. (2006) Control by fiddler crabs (*Uca vocans*) and plant roots (*Avicennia marina*) on carbon, iron, and sulfur biogeochemistry in mangrove sediment. *Limnol. Oceanogr.* **51**: 1557–1571.
- Kristensen, E., Jensen, M.H., Banta, G.T., Hansen, K., Holmer, M., and King, G.M. (1998) Transformation and transport of inorganic nitrogen in sediments of a southeast Asian mangrove forest. *Aquat. Microb. Ecol.* **15**: 165–175.
- Kusmana, C. (2014) Distribution and Current Status of Mangrove Forests in Indonesia. In, *Mangrove Ecosystems of Asia*. Springer, New York, NY, pp. 37–60.
- Lambs, L., Léopold, A., Zeller, B., Herteman, M., and Fromard, F. (2011) Tracing sewage water by  $^{15}\text{N}$  in a mangrove ecosystem to test its bioremediation ability. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **25**: 2777–2784.
- Laulan, P., Robbe, C., M'changama, M., Ali Sifari, B., Barthelat, F., and Rolland, R. (2006) Atlas des mangroves de Mayotte. *Serv. Environ. Dir. L'Agriculture For.* 145.
- Lee, S.Y. (1998) Ecological role of grapsid crabs in mangrove ecosystems: a review. *Mar. Freshw. Res.* **49**: 335–343.
- Lee, S.Y. (1995) Macrobenthic community structure of a polluted tidal river in Deep Bay, Hong Kong. *Mar. Biol. South China Sea II'Eds B Morton G Xu R Zou J Pan G Cai Pp* 43–51.
- Lee, S.Y. (1997) Potential trophic importance of the faecal material of the mangrove sesarmine crab *Sesarma messa*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **159**: 275–284.

- Lee, S.Y., Primavera, J.H., Dahdouh-Guebas, F., McKee, K., Bosire, J.O., Cannicci, S., et al. (2014) Ecological role and services of tropical mangrove ecosystems: a reassessment. *Glob. Ecol. Biogeogr.* **23**: 726–743.
- Lewis, M., Pryor, R., and Wilking, L. (2011) Fate and effects of anthropogenic chemicals in mangrove ecosystems: A review. *Environ. Pollut.* **159**: 2328–2346.
- Li, M. and Gu, J.-D. (2013) Community structure and transcript responses of anammox bacteria, AOA, and AOB in mangrove sediment microcosms amended with ammonium and nitrite. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 9859–9874.
- López-Medellín, X., Ezcurra, E., González-Abraham, C., Hak, J., Santiago, L.S., and Sickman, J.O. (2011) Oceanographic anomalies and sea-level rise drive mangroves inland in the Pacific coast of Mexico. *J. Veg. Sci.* **22**: 143–151.
- Lovelock, C.E. and Ball, M.C. (2002) Influence of Salinity on Photosynthesis of Halophytes. In, *Salinity: Environment - Plants - Molecules*. Springer, Dordrecht, pp. 315–339.
- Lovelock, C.E., Ball, M.C., Martin, K.C., and Feller, I.C. (2009) Nutrient enrichment increases mortality of mangroves. *PLOS ONE* **4**: e5600.
- Lovelock, C.E., Feller, I.C., McKee, K.L., Engelbrecht, B.M.J., and Ball, M.C. (2004) The effect of nutrient enrichment on growth, photosynthesis and hydraulic conductance of dwarf mangroves in Panamá. *Funct. Ecol.* **18**: 25–33.
- Luo, L., Meng, H., Wu, R., and Gu, J.-D. (2017) Impact of nitrogen pollution/deposition on extracellular enzyme activity, microbial abundance and carbon storage in coastal mangrove sediment. *Chemosphere* **177**: 275–283.
- Mandura, A.S. (1997) A mangrove stand under sewage pollution stress: Red Sea. *Mangroves Salt Marshes* **1**: 255–262.
- Marchand, C., Baltzer, F., Lallier-Vergès, E., and Albéric, P. (2004) Pore-water chemistry in mangrove sediments: relationship with species composition and developmental stages (French Guiana). *Mar. Geol.* **208**: 361–381.
- Martin, K.C., Bruhn, D., Lovelock, C.E., Feller, I.C., Evans, J.R., and Ball, M.C. (2010) Nitrogen fertilization enhances water-use efficiency in a saline environment. *Plant Cell Environ.* **33**: 344–357.
- McGuinness, K.A. (1997) Dispersal, establishment and survival of *Cerriops tagal* propagules in a north Australian mangrove forest. *Oecologia* **109**: 80–87.
- McKee, K.L. (1995) Mangrove Species Distribution and Propagule Predation in Belize: An Exception to the Dominance-Predation Hypothesis. *Biotropica* **27**: 334–345.
- Melvin, S.D. and Leusch, F.D.L. (2016) Removal of trace organic contaminants from domestic wastewater: A meta-analysis comparison of sewage treatment technologies. *Environ. Int.* **92**: 183–188.
- Metcalf and Eddy (2003) Wastewater engineering: treatment and reuse McGraw-Hill series (4ème édition).
- Mohamed, M.O.S., Mangion, P., Mwangi, S., Kairo, J.G., Dahdouh-Guebas, F., and Koedam, N. (2016) Are Peri-Urban Mangroves Vulnerable? An Assessment Through Litter Fall Studies. In, *Estuaries: A Lifeline of Ecosystem Services in the Western Indian Ocean*, Estuaries of the World. Springer, Cham, pp. 39–51.
- Moletta, R. (2011) Technologies de la méthanisation de la biomasse Déchets ménagers et agricoles. *La méthanisation*, 177.
- Molnar, N., Welsh, D.T., Marchand, C., Deborde, J., and Meziane, T. (2013) Impacts of shrimp farm effluent on water quality, benthic metabolism and N-dynamics in a mangrove forest (New Caledonia). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **117**: 12–21.
- Moore, P.G. (2002) Mammals in intertidal and maritime ecosystems: interactions, impacts and implications. In, *Oceanography and marine biology: an annual review*. Taylor & Francis, pp. 491–608.



- Moreno, M., Semprucci, F., Vezzulli, L., Balsamo, M., Fabiano, M., and Albertelli, G. (2011) The use of nematodes in assessing ecological quality status in the Mediterranean coastal ecosystems. *Ecol. Indic.* **11**: 328–336.
- Munns, R. and Tester, M. (2008) Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 651–681.
- Nagelkerken, I., Blaber, S.J.M., Bouillon, S., Green, P., Haywood, M., Kirton, L.G., et al. (2008) The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: A review. *Aquat. Bot.* **89**: 155–185.
- Nedwell, D.B. (1975) Inorganic nitrogen metabolism in a eutrophicated tropical mangrove estuary. *Water Res.* **9**: 221–231.
- Nettel, A. and Dodd, R.S. (2007) Drifting propagules and receding swamps: Genetic footprints of mangrove recolonization and dispersal along tropical coasts. *Evolution* **61**: 958–971.
- Netto, S.A. and Gallucci, F. (2003) Meiofauna and macrofauna communities in a mangrove from the Island of Santa Catarina, South Brazil. *Hydrobiologia* **505**: 159–170.
- Nogueira, N.M.C. and Ferreira-Correia, M.M. (2001) Cyanophyceae/Cyanobacteria in red mangrove forest at Mosquitos and Coqueiros estuaries, São Luís, State of Maranhão, Brazil. *Braz. J. Biol.* **61**: 347–356.
- Olguin, E.J., Hernandez, M.E., and Sanchez-Galvan, G. (2007) Hydrocarbon mangroves pollution and bioremediation, phytoremediation and restoration strategies. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **23**: 139–154.
- Paulus, A. (2011) Le filtre planté de roseaux: les filières compactes. *Eau Ind. Nuis.*
- Pearson, T.H. and Rosenberg, R. (1978) Macrobenthic succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment. *Ocean. Mar Biol Ann Rev* **16**: 229–311.
- Penha-Lopes, G., Bartolini, F., Limbu, S., Cannicci, S., Kristensen, E., and Paula, J. (2009) Are fiddler crabs potentially useful ecosystem engineers in mangrove wastewater wetlands? *Mar. Pollut. Bull.* **58**: 1694–1703.
- Penha-Lopes, G., Bartolini, F., Limbu, S., Cannicci, S., Mgaya, Y., Kristensen, E., and Paula, J. (2010) Ecosystem engineering potential of the gastropod *Terebralia palustris* (Linnaeus, 1767) in mangrove wastewater wetlands – A controlled mesocosm experiment. *Environ. Pollut.* **158**: 258–266.
- Penha-Lopes, G., Torres, P., Narciso, L., Cannicci, S., and Paula, J. (2009) Comparison of fecundity, embryo loss and fatty acid composition of mangrove crab species in sewage contaminated and pristine mangrove habitats in Mozambique. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **381**: 25–32.
- Pi, N., Tam, N.F.Y., and Wong, M.H. (2010) Effects of wastewater discharge on formation of Fe plaque on root surface and radial oxygen loss of mangrove roots. *Environ. Pollut.* **158**: 381–387.
- Prasad, M.B.K. (2012) Nutrient stoichiometry and eutrophication in Indian mangroves. *Environ. Earth Sci.* **67**: 293–299.
- Punwong, P., Marchant, R., and Selby, K. (2013) Holocene mangrove dynamics in Makoba Bay, Zanzibar. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **s 379–380**: 54–67.
- Rabinowitz, D. (1978) Dispersal properties of mangrove propagules. *Biotropica* 47–57.
- Ramachandran, P., Ramachandran, R., K Ray, A., and Rixen, T. (2008) Nitrogen cycling: A review of the processes, transformations and fluxes in coastal ecosystems. *Curr. Sci.* **94**:

- Ray, R., Majumder, N., Das, S., Chowdhury, C., and Jana, T.K. (2014) Biogeochemical cycle of nitrogen in a tropical mangrove ecosystem, east coast of India. *Mar. Chem.* **167**: 33–43.
- Reichmuth, J.M., Weis, P., and Weis, J.S. (2010) Bioaccumulation and depuration of metals in blue crabs (*Callinectes sapidus* Rathbun) from a contaminated and clean estuary. *Environ. Pollut.* **158**: 361–368.
- Robertson, A.A., Alongi, D.D., and others (1992) Tropical Mangrove Ecosystems. Coastal and Estuarine Studies. 41 American Geophysical Union.
- Rolland, R., Boulet, V., and Quod, J.P. (2005) Mayotte biodiversité et évaluation patrimoniale. *DAF Mayotte Conserv. Bot. Natl. Mascarin*.
- Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P., and Liesack, W. (1997) The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4704–4712.
- Ruffini Castiglione, M. and Cremonini, R. (2009) Nanoparticles and higher plants. *Caryologia* **62**: 161–165.
- Saenger, P. (2002) Mangrove Ecology, Silviculture and Conservation Springer Science & Business Media.
- Saintilan, N., Rogers, K., Mazumder, D., and Woodroffe, C. (2013) Allochthonous and autochthonous contributions to carbon accumulation and carbon store in southeastern Australian coastal wetlands. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **128**: 84–92.
- Saintilan, N., Wilson, N.C., Rogers, K., Rajkaran, A., and Krauss, K.W. (2014) Mangrove expansion and salt marsh decline at mangrove poleward limits. *Glob. Change Biol.* **20**: 147–157.
- Sakai, K. and Türkay, M. (2013) Revision of the genus Ocypode with the description of a new genus, Hoplocypode (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Mem. Qld. Mus.* **56**: 665–793.
- Schmit, J.P. and Shearer, C.A. (2003) A checklist of mangrove-associated fungi, their geographical distribution and known host plants. *Mycotaxon* **85**: 423–477.
- Shade, A., Peter, H., Allison, S.D., Baho, D.L., Berga, M., Bürgmann, H., et al. (2012) Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Front. Microbiol.* **3**.
- Shearer, C.A. and Raja, H.A. (2010) Freshwater Ascomycete Database.
- Shih, H.-T., Ng, P.K., Davie, P.J., Schubart, C.D., Türkay, M., Naderloo, R., et al. (2016) Systematics of the family Ocypodidae Rafinesque, 1815 (Crustacea: Brachyura), based on phylogenetic relationships, with a reorganization of subfamily rankings and a review of the taxonomic status of Uca Leach, 1814, sensu lato and its subgenera. *Raffles Bull. Zool.* **64**.
- Silambarasan, G., Ramanathan, T., and Kathiresan, K. (2012) Diversity of marine cyanobacteria from three mangrove environment in Tamil Nadu coast, South East coast of India. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* **4**: 235–238.
- Simpfendorfer, C.A. and Milward, N.E. (1993) Utilisation of a tropical bay as a nursery area by sharks of the families Carcharhinidae and Sphyrnidae. *Environ. Biol. Fishes* **37**: 337–345.
- Siva, S.M.F. (1991) Cyanophyceae associated with mangrove trees at Inhaca Island, Mozambique. *Bothalia* **21**: 143–150.
- Smith, B.D., Braulik, G., Strindberg, S., Ahmed, B., and Mansur, R. (2006) Abundance of Irrawaddy Dolphins (*Orcaella brevirostris*) and Ganges River Dolphins (*Platanista gangetica gangetica*) Estimated Using Concurrent Counts Made by Independent Teams in Waterways of the Sundarbans Mangrove Forest in Bangladesh. *Mar. Mammal Sci.* **22**: 527–547.

- Smith, P.E., Oakes, J.M., and Eyre, B.D. (2016) Recovery of nitrogen stable isotope signatures in the food web of an intermittently open estuary following removal of wastewater loads. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **182**: 170–178.
- Smith, T.J., Boto, K.G., Frusher, S.D., and Giddins, R.L. (1991) Keystone species and mangrove forest dynamics: the influence of burrowing by crabs on soil nutrient status and forest productivity. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **33**: 419–432.
- Smolders, A.J.P. and Roelofs, J.G.M. (1996) The roles of internal iron hydroxide precipitation, sulphide toxicity and oxidizing ability in the survival of *Stratiotes aloides* roots at different iron concentrations in sediment pore water. *New Phytol.* **133**: 253–260.
- Song, H.-S., Renslow, R.S., Fredrickson, J.K., and Lindemann, S.R. (2015) Integrating Ecological and Engineering Concepts of Resilience in Microbial Communities. *Front. Microbiol.* **6**.
- Sousa, W.P. and Dangremond, E.M. (2011) Trophic interactions in coastal and estuarine mangrove forest ecosystems. *Treatise Estuar. Coast. Sci.* **6**: 43–93.
- Souza, I. da C., Rocha, L.D., Morozesk, M., Bonomo, M.M., Arrivabene, H.P., Duarte, I.D., et al. (2015) Changes in bioaccumulation and translocation patterns between root and leaf of *Avicennia schaueriana* as adaptive response to different levels of metals in mangrove system. *Mar. Pollut. Bull.* **94**: 176–184.
- Spalding, M., Blasco, F., and Field, C. (1997) World mangrove atlas. International Society for Mangrove Ecosystems.
- Spalding, M., Kainuma, M., and Collins, L. (2010) World Atlas of Mangroves 2nd edition. Earthscan.
- Spiegelberger, T. and Ganslosser, U. (2005) Habitat analysis and exclusive bank feeding of the Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus* L. 1758) in the Cosvine Swamps of French Guiana, South America. *Trop. Zool.* **18**: 1–12.
- Steinke, T.D., Rajh, A., and Holland, A.J. (1993) The feeding behaviour of the red mangrove crab *Sesarma meinerti* De Man, 1887 (Crustacea: Decapoda: Grapsidae) and its effect on the degradation of mangrove leaf litter. *South Afr. J. Mar. Sci.* **13**: 151–160.
- Stottmeister, U., Wießner, A., Kusch, P., Kappelmeyer, U., Kästner, M., Bederski, O., et al. (2003) Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnol. Adv.* **22**: 93–117.
- Sutherland, T.F., Levings, C.D., Petersen, S.A., Poon, P., and Piercey, B. (2007) The use of meiofauna as an indicator of benthic organic enrichment associated with salmonid aquaculture. *Mar. Pollut. Bull.* **54**: 1249–1261.
- Taketani, R.G., Dos Santos, H.F., van Elsas, J.D., and Rosado, A.S. (2009) Characterisation of the effect of a simulated hydrocarbon spill on diazotrophs in mangrove sediment mesocosm. *Antonie Van Leeuwenhoek* **96**: 343–354.
- Tam, N.F.Y. (1998) Effects of wastewater discharge on microbial populations and enzyme activities in mangrove soils. *Environ. Pollut.* **102**: 233–242.
- Tam, N.F.Y., Wong, A.H.Y., Wong, M.H., and Wong, Y.S. (2009) Mass balance of nitrogen in constructed mangrove wetlands receiving ammonium-rich wastewater: Effects of tidal regime and carbon supply. *Ecol. Eng.* **35**: 453–462.
- Tam, N.F.Y. and Wong, Y.S. (1995) Mangrove soils as sinks for wastewater-borne pollutants. *Hydrobiologia* **295**: 231–241.
- Tam, N.F.Y. and Wong, Y.S. (1996) Retention and distribution of heavy metals in mangrove soils receiving wastewater. *Environ. Pollut.* **94**: 283–291.

- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., Lan, C.Y., and Wang, L.N. (1998) Litter production and decomposition in a subtropical mangrove swamp receiving wastewater. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **226**: 1–18.
- Thom, B.G., Snedaker, S., and Snedaker, J. (1984) The mangrove ecosystem: research methods. *Mangrove Ecosyst. Res. Methods Monogr. Oceanogr. Methodol.* 3–15.
- Thomas, N., Lucas, R., Bunting, P., Hardy, A., Rosenqvist, A., and Simard, M. (2017) Distribution and drivers of global mangrove forest change, 1996–2010. *PLOS ONE* **12**: e0179302.
- Thongo, A. (2016) Les mangroves à Mayotte. Etat des lieux et enjeux de gestion. Rapport bibliographique. *ONF Mayotte* 1–47.
- Tjandraatmadja, G., Cook, S., Pollard, C., Sheedy, C., Gozukara, Y., Marleni, N., and Diaper, C. (2010) Sources of priority contaminants in domestic wastewater Water for a Healthy Country National Research flagship, CSIRO Publishing.
- Tjandraatmadja, G., Diaper, C., Gozukara, Y., Burch, L., Sheedy, C., and Price, G. (2008) Sources of priority contaminants in domestic wastewater:contaminant loads from household products Water for a Healthy Country National Research flagship, CSIRO Publishing.
- Tomlinson, P.B. (2016) The Botany of Mangroves Cambridge University Press.
- UNEP (2013) Mangrove forest cover fading fast. *UNEP Sioux Falls* 1–10.
- Visser, E.J.W., Colmer, T.D., Blom, C., and Voesenek, L. (2000) Changes in growth, porosity, and radial oxygen loss from adventitious roots of selected mono- and dicotyledonous wetland species with contrasting types of aerenchyma. *Plant Cell Environ.* **23**: 1237–1245.
- Wang, M., Zhang, D.Q., Dong, J.W., and Tan, S.K. (2017) Constructed wetlands for wastewater treatment in cold climate — A review. *J. Environ. Sci.* **57**: 293–311.
- Wang, M., Zhang, J., Tu, Z., Gao, X., and Wang, W. (2010) Maintenance of estuarine water quality by mangroves occurs during flood periods: A case study of a subtropical mangrove wetland. *Mar. Pollut. Bull.* **60**: 2154–2160.
- Wang, Y., Qiu, Q., Yang, Z., Hu, Z., Tam, N.F.-Y., and Xin, G. (2010) Arbuscular mycorrhizal fungi in two mangroves in South China. *Plant Soil* **331**: 181–191.
- Wear, R.J. and Tanner, J.E. (2007) Spatio-temporal variability in faunal assemblages surrounding the discharge of secondary treated sewage. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **73**: 630–638.
- White, W.T. and Potter, I.C. (2004) Habitat partitioning among four elasmobranch species in nearshore, shallow waters of a subtropical embayment in Western Australia. *Mar. Biol.* **145**: 1023–1032.
- Wickramasinghe, S., Borin, M., Kotagama, S.W., Cochard, R., Anceno, A.J., and Shipin, O.V. (2009) Multi-functional pollution mitigation in a rehabilitated mangrove conservation area. *Ecol. Eng.* **35**: 898–907.
- Wong, Y.S., Lan, C.Y., Chen, G.Z., Li, S.H., Chen, X.R., Liu, Z.P., and Tam, N.F.Y. (1995) Effect of wastewater discharge on nutrient contamination of mangrove soils and plants. *Hydrobiologia* **295**: 243–254.
- Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., and Lan, C.Y. (1997) Mangrove wetlands as wastewater treatment facility: a field trial. In, Wong,Y.-S. and Tam,N.F.-Y. (eds), *Asia-Pacific Conference on Science and Management of Coastal Environment*, Developments in Hydrobiology. Springer Netherlands, pp. 49–59.
- Wu, Y., Chung, A., Tam, N.F.Y., Pi, N., and Wong, M.H. (2008) Constructed mangrove wetland as secondary treatment system for municipal wastewater. *Ecol. Eng.* **34**: 137–146.

- Zhang, Z.-W., Xu, X.-R., Sun, Y.-X., Yu, S., Chen, Y.-S., and Peng, J.-X. (2014) Heavy metal and organic contaminants in mangrove ecosystems of China: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21**: 11938–11950.
- Zhou, X., Cai, L., and Fu, S. (2015) Comparison of meiofaunal abundance in two mangrove wetlands in Tong'an Bay, Xiamen, China. *J. Ocean Univ. China JOUC* **14**: 816.



**Résumé :** Les mangroves sont des forêts côtières des régions tropicales et subtropicales, situées dans la zone de balancement des marées. Elles fournissent un grand nombre de services écosystémiques aux sociétés humaines et aux milieux adjacents (ressources, habitats, protection). Les mangroves sont continuellement affectées par des variations environnementales naturelles (salinité, température, cycle des marées) mais elles sont également le réceptacle d'effluents anthropiques (aquacultures, centres urbains). Il a été suggéré que ces forêts humides pourraient participer à la bio-épuration d'eaux usées domestiques (EUD). Les objectifs de la thèse étaient à la fois d'apporter des éléments pouvant ultérieurement servir à définir un cadre pour cet usage spécifique d'un écosystème naturel, et, sur le plan plus fondamental, d'évaluer les capacités de résistance et de résilience à court et long termes d'une mangrove soumise à une perturbation anthropique contrôlée. Le travail de thèse s'est appuyé sur un système expérimental fonctionnant depuis 2008 dans la plus grande mangrove de l'île de Mayotte. Dans ce système pilote, des EUD prétraitées sont quotidiennement déversées dans deux zones de mangroves dominées par les palétuviers *Ceriops tagal* ou *Rhizophora mucronata* et ayant des caractéristiques contrastées. Plusieurs campagnes d'échantillonnage ont permis de suivre *in situ* l'impact de l'excès de nutriments et d'eau douce sur la végétation, les crabes, la méiofaune et les communautés microbiennes, et de déterminer leurs capacités de résistance et de résilience. Dans ce travail, les EUD ont fortement stimulé la croissance de la végétation, modifié la structure des populations de crabes, de méiofaune, et des communautés microbiennes, et induit une hausse des densités et des activités des microorganismes impliqués dans le cycle de l'azote. Ceci n'a cependant pas entraîné de dysfonctionnement majeur de l'écosystème (perte massive de couvert végétal ou forte régression des populations de crabes). L'observation de l'écosystème sur deux ans après l'arrêt d'apports d'EUD a également mis en évidence une capacité notable de résilience de la mangrove. Enfin, les résultats de cette étude indiquent que la zone dominée par *R. mucronata* serait plus apte à recevoir les EUD prétraitées dans le cadre de leur bio-épuration par la mangrove car moins impactée.

**Mots clés :** mangrove, stabilité, perturbation anthropique, effluents domestiques, bio-épuration, palétuviers, crabes, communautés microbiennes.

**Abstract:** Mangroves are coastal forests in (sub)tropical regions, located in the intertidal zone. They provide a many ecosystem services to human societies and neighboring ecosystems (resources, habitats, protection). Mangroves are continually affected by natural stresses (salinity, temperature, tidal cycle) but they are also subjected to anthropogenic effluents (aquaculture, urban centers). It was suggested that mangroves may be used for the bio-epuration of domestic wastewaters. This thesis aims at providing elements that will help defining the framework for this specific usage of a natural ecosystem and evaluating the long- and short-term resistance and resilience abilities of mangroves subjected to an anthropic disturbance. To reach these objectives, we used an experimental system set up in the largest mangrove of the island Mayotte. In this system, pretreated wastewaters (PW) are daily discharged in two mangrove zones dominated by *Ceriops tagal* or *Rhizophora mucronata*. Several sampling campaigns allowed to monitor *in situ* the impact of nutrient and freshwater excess on vegetation, crabs, meiofauna, and microbial communities and to determine their resistance and resilience capacities. In this work, PW strongly stimulated vegetation growth, altered the structure of crabs and meiofauna, modified the microbial structure and increased microbial density and activity of microorganisms involved in nitrogen cycle. However, no major dysfunction of the ecosystem (loss of vegetation, strong decrease in crab density) was observed. The monitoring of the ecosystem during two years after the PW discharge was stopped showed a marked ability of the mangrove to recover from the disturbance. Finally, the results indicate that *R. mucronata* mangrove zone, less disturbed, is more able to receive discharges for bio-epuration of domestic PW by mangrove ecosystem.

**Key words:** mangrove, stability, anthropic disturbance, domestic effluents, bio-epuration, mangrove trees, crabs, microbial communities.